

N° D'ORDRE :

43

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GABRIEL MANDILLON

*Docteur en Médecine,
Médecin Capitaine des Troupes Métropolitaines
Ancien Interne des Hôpitaux de Bordeaux
Assistant de Chirurgie des Hôpitaux Militaires*

1^{re} THÈSE. — ACTION DU BROMACÉTATE DE SOUDE SUR LES BASES ORGANIQUES ET LES TOXINES MICROBIENNES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ. LES HORMONES SEXUELLES, LEUR ACTION DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL.

Soutenue le 16 Novembre 1935 devant la Commission d'examen

JURY :

Président..... MM. CHAINE, professeur, doyen de la Faculté des Sciences.

Examineurs... } GENEVOIS, professeur.
 } CHOUARD, maître de conférences.

BORDEAUX
IMPRIMERIE BRUSAU FRÈRES

143, Rue d'Arès, 143

1935

N° D'ORDRE :
43

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

GABRIEL MANDILLON

*Docteur en Médecine
Médecin Capitaine des Troupes Métropolitaines
Ancien Interne des Hôpitaux de Bordeaux
Assistant de Chirurgie des Hôpitaux Militaires*

1^{re} THÈSE. — ACTION DU BROMACÉTATE DE SOUDE SUR LES BASES ORGANIQUES ET LES TOXINES MICROBIENNES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ. LES HORMONES SEXUELLES, LEUR ACTION DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL.

Soutenue le 16 Novembre 1935 devant la Commission d'examen

JURY :

Président..... MM. CHAÎNE, professeur, doyen de la Faculté des Sciences.
Examineurs .. } GENEVOIS, professeur.
 } CHOUARD, maître de conférences.

BORDEAUX
IMPRIMERIE BRUSAU FRÈRES

143, Rue d'Arès, 143

1935

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen **CHAINE** Anatomie comparée et Embryogénie.

Doyens honoraires. { **PADÉ** Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
PICARD Astronomie.
DUPONT Prof^r à la Faculté des Sciences de Paris.

Professeurs honoraires. { **BÉNARD**.
VIGOUROUX.
SAUVAGEAU.
BOUNHIOL.
DEVAUX.
RICHARD.
DUPONT.

PICART Astronomie.
GUINCHANT .. Physique générale.
CHAINE Anatomie comparée et Embryogénie.

TROUSSET ... Mécanique raditionnelle.
MERCIER Physique expérimentale.
DAGUIN Géologie et Minéralogie.
DAURE Physique.
FEYTAUD Zoologie et Physiologie animale.

DANGEARD ... Botanique.
GENEVOIS ... Physiologie végétale et chimie biologique.
MILLOUX Calcul infinitésimal et Analyse supérieure.
TRUCHET Chimie organique.
N Chimie minérale et Chimie physique.

Chargé du service d'une chaire { **QUÉLET**.

Maître de conf. hono^r. { **MANVILLE**.

Maîtres de conférences. { **AVEL** Zoologie.
BRUS Chimie.
CHOUARD Botanique.

Maître de conf. adjoint { **ARRIVAUT**.

Secrétaire .. **ARTIGUELONG**.



A MON PERE. — A MA MERE

Hommage de tendre et affectueuse
reconnaissance filiale.

A MA GRAND'MERE.

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS'PARENTS

A TOUS LES MIENS.

A MONSIEUR MANVILLE,
Maître de Conférences honoraire
à la Faculté des Sciences de Bordeaux.

A MONSIEUR L. GLANGEAUD,
Docteur ès-Sciences,
Chargé de Conférences
à la Faculté des Sciences de Bordeaux.

A MES MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE,
DES HOPITAUX DE BORDEAUX,
DU SERVICE DE SANTE ET DU VAL-DE-GRACE.

MEIS ET AMICIS

A MON MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR COURBOULES,

*Médecin Colonel,
Médecin-Chef de l'Hôpital R. Picqué,
Professeur agrégé du Val-de-Grâce,
Chirurgien des Hôpitaux militaires,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de Guerre.*

Respectueux hommage de gratitude.

A MON MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. GENEVOIS,

*Professeur de Chimie biologique et de Physiologie végétale
à la Faculté des Sciences de Bordeaux.*

Hommage de profonde et reconnaissante admiration.

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE JURY DE THESES

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. CHAINE,

*Professeur d'Anatomie comparée et Embryogénie,
Doyen de la Faculté des Sciences de Bordeaux,
Directeur du Muséum d'Histoire Naturelle de la Ville de Bordeaux,
Officier de l'Instruction Publique,
Chevalier de la Légion d'honneur.*

PREMIÈRE THÈSE

**Action du bromacétate de soude
sur les bases organiques et les toxines
microbiennes**

ACTION DU BROMACÉTATE DE SOUDE

SUR LES

Bases organiques et les Toxines microbiennes

PREFACE

Avant d'aborder le sujet que nous avons choisi pour notre thèse, nous voudrions exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui nous ont facilité notre tâche, tant au point de vue scientifique qu'au point de vue médical.

Que notre maître, M. le Professeur Genevois, qui nous a guidé de ses conseils éclairés, nous permette de le remercier de son aimable accueil dans son laboratoire et de l'aide si précieuse qu'il nous a donnée pour la réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à MM. les Professeurs Dubreuil et Aubertin, qui nous ont permis si aimablement l'accès des laboratoires de l'Institut Pasteur de Bordeaux et ont mis à notre disposition le matériel voulu pour nos études sur la toxine diphtérique.

Nous voudrions également remercier ceux qui, depuis l'époque déjà lointaine de notre doctorat en médecine, ont contribué, dans une si large mesure, à notre perfectionnement dans l'art médical.

Nos remerciements s'adressent, tout d'abord, à M. le Docteur Rabère, chirurgien des Hôpitaux, dont nous fûmes l'interne pendant près de deux ans et à qui nous devons, en grande partie, notre formation chirurgicale.

M. le Professeur Dupérié nous initia aux recherches dans son laboratoire.

Chez M. le Docteur Charbonnel nous pûmes apprécier sa maîtrise chirurgicale.

M. le Professeur Réchou mit à notre disposition toutes les ressources de son installation électroradiologique et ses conseils si judicieux.

M. le Professeur Courboulès a toujours été pour nous un chef bienveillant et, par sa noble conception du devoir médical, un maître auquel on s'attache et que l'on veut prendre pour modèle.

M. le Médecin général inspecteur Baron et M. le Médecin général Grenier de Cardenal trouveront ici l'expression de notre reconnaissance pour les encouragements qu'ils nous ont toujours prodigués.

Que tous ceux qui nous ont aidé soient remerciés.

A M. le Doyen Chainé, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, notre vive gratitude et l'assurance de nos sentiments respectueusement dévoués.

INTRODUCTION

Parmi les substances biologiques actives, sur les êtres vivants, à très faible dose, beaucoup se comportent comme des bases faibles ; ce sont les amines biologiques, comme l'histamine, l'immense variété des alcaloïdes, les poisons curarisants dont les effets se retrouvent dans les bases d'ammonium quaternaire liposolubles, du type du triméthyl-octylammonium.

Il y a donc intérêt à pouvoir doser, ou seulement bloquer en milieu sensiblement neutre très étendu, la fonction base organique faible. Ce résultat peut être atteint avec des concentrations relativement élevées (supérieures à N/5) de formol ou d'une autre aldéhyde ; une très faible partie de l'aldéhyde réagit dans ces conditions, en sorte que si la fonction base est bloquée, une titration même approchée de la fonction base organique est pratiquement impossible, si l'on doit se fonder uniquement sur la quantité d'aldéhyde combinée.

Il nous a été possible, au contraire, de montrer :

1° Que le Bromacétate de soude en milieu sensiblement neutre, se combine, quantitativement, même à assez hautes dilutions (N/200) à des bases organiques telles que strychnine, histidine, arginine, à des acides aminés (alanine, acide glutamique, asparagine). Il suffit qu'il y ait un excès modéré de bromacétate (de trois à quatre fois la quantité du corps à doser) en sorte qu'il est possible de titrer grossièrement la fonction base faible d'après la quantité de bromacétate combiné.

2° La combinaison ne se fait que si le pH du milieu est su-

périeur à une certaine valeur; au-dessous de $\text{pH}=5$, le bromacétate, qui passe d'ailleurs à l'état d'acide bromacétique, ne se combine plus aux bases organiques faibles. En suivant avec soin, pour chaque corps, la limite de la réaction en fonction du pH , on s'aperçoit que chaque corps présente une allure différente dans sa combinaison avec le bromacétate. Il est donc, au moins théoriquement, possible de doser par cette méthode un mélange d'acides aminés et de bases organiques faibles, les diverses fonctions réagissant indépendamment les unes des autres.

3° La fonction base organique faible est responsable à nos yeux de la toxicité de corps comme la strychnine; la strychnine combinée au bromacétate en milieu neutre homogène, a perdu toute espèce de toxicité. Le bromacétate se comporte comme un neutralisant de sa fonction toxique.

4° Si l'on met le bromacétate en contact avec la toxine diphtérique en milieu étendu, il y a disparition d'une façon complète de la toxicité de la toxine; en même temps, une quantité dosable de bromacétate disparaît du milieu, en tant que bromacétate libre.

La disparition de la toxicité et la combinaison du bromacétate sont deux phénomènes qui vont de pair; il suffit soit d'abaisser le pH au-dessous de 6,0, soit de maintenir le mélange toxine-bromacétate à 0° pour empêcher toute combinaison et toute perte de toxicité.

Les phénomènes étudiés ici ne sont pas sans analogies :

a) Avec la réaction de Sørensen: combinaison des aldéhydes et des bases organiques faibles, ammoniaque, acides aminés;

b) Avec la formation d'anatoxine selon la méthode de Ramon (combinaison d'une aldéhyde et particulièrement de l'aldéhyde formique et d'une toxine microbienne : toxine diphtérique, tétanique, dysentérique, staphylococcique);

c) Avec la formation des cryptotoxines, selon la méthode de Vincent.

Le bromacétate, qui réagit par son brome, remplace les al-

déhydes des méthodes de Sörensen et de Ramon, et les acides (acides salicylique et dérivés, savons) de la méthode de Vincent.

Le bromacétate se distingue des corps employés jusqu'ici par son énorme puissance réactive : un milligramme de bromacétate neutralise 1.000 doses mortelles cobayes de toxine diphtérique. Les bromacétates parfaitement solubles ne forment point de savons ; il s'agit donc d'une véritable combinaison chimique spécifique. Le brome combiné agit en tant que groupement électronégatif, possédant, malgré sa combinaison, un résidu d'affinité suffisant pour donner des combinaisons stables. Il paraît vraisemblable que le groupement carboxyle des aldéhydes, ou la fonction phénol des α oxyacides de la série aromatique (acide α oxynaphtoïque, acide diiodo α oxybenzoïque ou acide diiodosalicylique) ait un mécanisme d'action analogue.

Les anatoxines de Ramon possèdent un pouvoir immunisant considérable et ont conservé le pouvoir flocculant des toxines dont elles dérivent ; les cryptotoxines de Vincent ont un pouvoir immunisant plus faible et ont perdu tout pouvoir flocculant ; la toxine diphtérique traitée par le bromacétate n'a plus qu'un faible pouvoir immunisant, mais a conservé 80 à 90 % du pouvoir flocculant de la toxine primitive.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Il y a de nombreuses années que les dérivés halogénés de l'acide acétique sont connus. Leblanc, en 1849, prépara l'acide monochloracétique. Perkin et Duppa préparèrent, en 1858, l'acide monobromacétique et, en 1859, l'acide monoiodacétique.

On connut, tout d'abord, leur rôle en tant qu'agents de synthèse de corps organiques.

Leur rôle, surtout pour l'acide monobromacétique et l'acide monoiodacétique et leur action dans le domaine biologique restèrent complètement dans l'ombre.

Il faut, en 1925, les travaux de l'école de Strasbourg, de Schwartz et Oschmann et, en 1930, les publications de Lündsgaard sur leur action sur la fermentation cellulaire pour que de nombreux auteurs s'attaquent à cette étude.

Depuis, il y a eu un grand nombre de mémoires et de notes publiés sur ce sujet. L'école bordelaise, avec mon maître, M. le Professeur Genevois et ses élèves, principalement Génaud, Brisou et Cayrol, se sont attachés surtout à l'étude de l'action de l'acide monobromacétique et ont été les premiers à montrer que celle-ci était composable à celle de l'acide monoiodacétique.

Il y a, cependant, une différence qui réside dans le fait que l'acide monoiodacétique libre par hydrolyse de l'iode à l'état naissant, alors que l'acide bromacétique libre uniquement le brome sous forme d'acide bromhydrique transformé en bromures produits biologiquement peu actifs. Cette différence n'a guère d'importance dans bon nombre de phénomènes biologiques, mais dans des cas que nous étudierons (toxines par exemple), l'interprétation des faits observés aurait pu prêter à confusion.

L'acide bromacétique et les bromacétates sont des corps à grande affinité chimique et nous les avons vus former avec toute une série de corps organiques des complexes dont la stabilité est grande et que nous sommes arrivés à doser avec une assez grande précision et dans des conditions expérimentales relativement simples.

Neuberg et Kobel, en 1934, avaient montré que l'acide monoiodacétique en solution étendue (N/200) se combine en milieu neutre ou alcalin à quelques acides aminés et bases organiques employées en grand excès (N/20 à N/10). Neuberg et Kobel n'ont fait aucun dosage chimique; ils se sont contentés de montrer que l'acide iodacétique perd en solution N/1000 tout pouvoir inhibiteur sur la levure. Ils trouvèrent que l'arginine à $\text{pH} = 7$ ne se combine pas à l'acide iodacétique à 37° en deux jours, tandis que la combinaison se fait à $\text{pH} = 9,8$ en 19 heures à 24° ; l'alanine ne se combine pas non plus en milieu neutre (à 37° deux jours), mais se combine à $\text{pH} = 11,2$ d'une façon pratiquement complète (à 24° , en 20 heures); l'aniline se combine à $\text{pH} = 7$ en 19 heures d'une façon incomplète à 24° et presque complète à 37° .

Ils n'étudièrent pas d'autres corps que ces trois; la seule conclusion que l'on peut tirer de leur mémoire c'est que les acides aminés paraissent se combiner en milieu franchement alcalin ($\text{pH} = 9$) à l'acide iodacétique dans les conditions où il y a un grand excès du corps aminé par rapport à l'acide halogéné. Ils n'obtinrent pas, sauf avec l'aniline, de combi-

raison décelable par leurs procédés très primitifs en milieu sensiblement neutre.

La question de la combinaison des acides aminés en milieu neutre avec les acides halogénés restait donc entièrement à élucider.

CHAPITRE II

Mise au point d'une méthode de dosage des bromacétates alcalins en présence de matières organiques

Le principe de cette méthode repose sur la formation, à température relativement basse, avec une vitesse mesurable, même à la température ordinaire, d'un complexe entre le bromacétate à l'état libre et l'hyposulfite de soude, les complexes bromacétates-corps organiques n'étant pas décomposés, le bromacétate combiné ne réagit donc pas avec $S_2 O_3 Na_2$.

Slator, en 1905, montre que les bromacétates réagissent molécule à molécule avec l'hyposulfite de soude à des vitesses mesurables et relativement rapides même à température ordinaire.

Il faut arriver aux travaux de Victor-K. La Mer (1929) pour trouver proposée une méthode de titration rapide des bromacétates hormis la méthode d'hydrolyse en milieu alcalin à chaud.

Cette méthode de dosage n'est pas applicable dans les solutions de matières organiques attaquables par les alcalis à chaud.

V.-K. La Mer attire l'attention sur la réaction suivante :

$Br\ CH_2\ COO^- + S_2\ O_3^{--} \longrightarrow S_2\ O_3\ CH_2\ COO^- + Br^-$
dans laquelle l'halogène est remplacé par l'hyposulfite mo-

lécule à molécule. Cette réaction est particulièrement exempte, dit cet auteur, de réactions secondaires; nous ajouterons dans certaines conditions de pH.

Elle permet, dit K. La Mer, de suivre exactement la marche des réactions des bromacétates, et voici résumée la technique de dosage proposée par cet auteur :

« On suit la réaction en mélangeant des quantités équivalentes d'hyposulfite de soude et de bromacétate de soude. Au bout d'un certain temps, on ajoute un excès de solution iodée et on titre ensuite l'excès d'iode en retour par l'hyposulfite de soude. »

Ce n'est que dans les cas de solutions très diluées que cet auteur dose directement, à l'aide de la liqueur titrée d'iode, l'excès d'hyposulfite.

Dans tout ce travail, nous nous sommes servis d'un titrage direct à la liqueur d'iode N/100.

L'expérience nous a montré qu'en mettant en présence du bromacétate en solution aqueuse avec un excès d'hyposulfite de soude ces deux corps réagissent molécule à molécule et qu'il suffit de titrer à l'iode l'excès d'hyposulfite restant pour avoir très exactement la quantité de bromacétate en solution.

Quand le bromacétate est combiné avec une base organique ou un acide aminé dans certaines conditions de pH, l'hyposulfite ne déplace pas le corps organique de sa combinaison avec le bromacétate.

La source du bromacétate dont nous nous sommes servi a été la même que celle du bromacétate dont s'est servi V.-K. La Mer. Dans les deux cas, il s'agissait d'acide bromacétique de Kahlbaum.

Progressivement, nous nous sommes rendus compte que pour avoir une série de mesures correctes, il fallait prendre certaines précautions:

1° Le complexe met un certain temps à se former (vitesse de réaction bien connue):

- A 0°, le complexe n'est pas formé après un mois;
- A la température du laboratoire, 20° centigrades environ, il faut compter plusieurs jours avant que la combinaison soit totale;
- A 40°, il faut compter une vingtaine d'heures;
- A 60°, il faut compter 1 heure à 2 heures;
- A l'ébullition au bain-marie, le complexe se forme en quelques minutes; on peut dire qu'au bout de dix minutes, la combinaison est totale. L'hydrolyse du bromacétate n'est pas influencée par la présence d'autres corps en solution dans les mêmes conditions de pH. La relativité des mesures est donc conservée.

2° Il faut opérer entre certaines concentrations relatives des différents corps.

Si l'excès d'hyposulfite n'est pas trop important, la formation du complexe entre le bromacétate et l'hyposulfite se fait molécule à molécule, la liqueur reste limpide et il n'y a pas formation d'un précipité de soufre.

Si la quantité d'hyposulfite est cinq fois supérieure à celle du bromacétate mise en sa présence, la marche de la formation du complexe n'est plus simple; il faut plus d'une molécule d'hyposulfite pour neutraliser une molécule de bromacétate.

3° Il faut opérer dans un certain intervalle de pH.

Les résultats les plus justes nous ont paru être obtenus aux environs de $\text{pH} = 5$. La combinaison se fait bien encore entre $\text{pH} = 3,5$ et $\text{pH} = 7$.

Si on essaie de doser l'acide monobromacétique en milieu alcalin, l'hydrolyse de celui-ci à température du bain-marie est tellement rapide qu'il y a là une source d'erreurs.

D'autre part, le dosage de l'hyposulfite par l'iode demande à être effectué, pour être exact, entre $\text{pH} = 3,80$ et $\text{pH} = 6$ environ.

En dehors de ces limites, ce dosage s'avère peu précis, et le coefficient d'erreurs atteint 10 à 15 %, d'après nos expériences.

Voici, à titre indicatif, quelques mesures que nous avons faites : la solution d'hyposulfite de soude était exactement N/10; le dosage pratiqué avec de l'iode N/100.

TABLEAU I

pH	$\text{S}_2 \text{O}_3 \text{Na}_2$ 10cc3 N/10 = 1000 micromolécules	$\text{C H}_3 \text{COOH}$ pur	I micromolécules
3,64	1000	1 cc.	982
			970
	id.		963
2,46	1000	2 cc.	923
			923
	id.		897
2,30	1000	3 cc.	880
			887
	id.		903
2,20	1000	4 cc.	870
			860
	id.		833

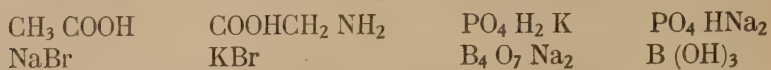
Remarques

Il y avait un précipité de soufre colloïdal dans tous les tubes.

Les pH sont mesurés après mélange, au moyen de l'électrode de verre.

Nous avons voulu nous rendre compte si la présence de corps étrangers ne gênaient pas le dosage de l'excès d'hyposulfite par la liqueur d'iode. Nous avons successivement ajouté

au milieu une certaine quantité (de 100 à 300 micromolécules pour 1.000 micromolécules d'hyposulfite) des corps suivants :



La présence de ces différents corps n'a nullement gêné la réaction.

Seul, le pH jouait un rôle dans l'apparition du louche de soufre colloïdal; les quelques dosages suivants, donnés à titre d'exemple, le démontrent (quantités en micromolécules) :

TABLEAU II

pH	$\text{S}_2 \text{O}_3 \text{Na}_2$	$\text{CH}_2 \text{NH}_2 \text{COOH}$	$\text{B}(\text{OH})_3$	$\text{B}_3 \text{O}_7 \text{Na}_2$	I
4,56	1000	362	50	250	1010 1025 1000
4,10	1000	362	50	250	995 1003 1002
3,86	1000	362	50	250	1003 1011 1002
3,74	1000	362	50	250	1000 990 1000
3,58	1000	362	70	230	1005 996 1000
3,30	1000	362	70	230	978 986 988

En effet, ce n'est que dans le dernier dosage à $\text{pH} = 3,30$,

que le louche de soufre colloïdal commençait à faire son apparition malgré la présence des corps ajoutés. Les différents pH étaient obtenus par l'adjonction d'une certaine quantité, de 1 à 4 cc., d'acide acétique cristallisable.

Nous sommes arrivés au protocole expérimental suivant :

a) Préparation de la solution contenant en proportions connues :

1° Solution tampon (1): 10 cc.;

2° Bromacétate de soude: 600 à 900 micromolécules;

3° Corps à étudier: 100 à 300 micromolécules;

b) Préparation de tubes témoins contenant seulement la solution tampon et le bromacétate de soude;

c) Mise au bain-marie à 60° des tubes ainsi préparés pendant 1 heure;

d) Addition d'une quantité connue d'hyposulfite de soude 1.000 à 1.400 micromolécules à l'aide d'une solution N/10. On ajoutait ensuite, si besoin était, de l'acide acétique pour ramener le pH du milieu entre 3,5 et 5,5;

e) Ce mélange était porté au bain-marie à 100° pendant 10 minutes;

f) On dosait l'excès d'hyposulfite restant dans la solution, par une liqueur titrée d'iode N/100;

L'indicateur employé pour indiquer la fin de la réaction a été l'empois d'amidon. Le virage de cet indicateur, sous l'effet d'un léger excès d'iode, s'est révélé très sensible; 1/10 de cc. de solution d'iode N/100 suffisait à le produire. De ce côté, l'exactitude de la réaction de dosage était donc obtenue à une micromolécule près.

Pour suivre la marche de la réaction et nous rendre compte aussi exactement que possible des termes de celle-ci, d'une part et, d'autre part, pour exécuter le dosage dans les condi-

(1) Nous nous sommes servis des types suivants de solution tampon, phosphate monopotassique + phosphate disodique, acide borique + borate de soude, borate de soude + soude, acide acétique + acétate de soude, en proportions variables suivant le pH désiré.

tions de pH requises, nous avons fait, en moyenne, à l'aide de la méthode électrométrique, les mesures suivantes de pH pour chaque série de dosages :

1° Mesure du pH de la solution tampon;

2° Mesure du pH de la liqueur préparée, d'une part, avec le corps étudié et, d'autre part, des tubes témoins;

3° pH après le bain-marie à 60°;

4° pH après l'acidification du milieu à l'acide acétique, si besoin était;

5° pH après le bain-marie à ébullition au moment du dosage.

Nous avons eu soin d'effectuer toutes ces mesures de pH à l'aide de tubes spéciaux qui ne servaient pas ensuite aux dosages, de manière à éviter les erreurs dues à la perte de liquide au cours des manipulations.

Pour obtenir des chiffres aussi exacts que possible, nous avons toujours effectué, pour chaque chiffre que nous donnerons au cours de ce travail, plusieurs mesures de 3 à 10, et pris leur moyenne afin d'éviter, dans la mesure du possible, les erreurs mécaniques dues aux manipulations.

Ainsi donc, au lieu de mesurer la cinétique de la réaction bromacétate, hyposulfite de Na étude de V.-K. La Mer, nous nous sommes servis de cette réaction pour montrer l'existence de complexes entre l'acide bromacétique et un certain nombre de corps organiques, et nous sommes arrivés à doser la fonction base organique faible en solution étendue avec une approximation allant dans certains cas à 1/100 près.

CHAPITRE III

ACTION DU BROMACETATE SUR LES ACIDES AMINES ET BASES ORGANIQUES

La notion de formation de complexes entre le bromacétate de soude et différents corps organiques remonte déjà à un certain nombre d'années.

La réaction de l'acide bromacétique avec la triméthylamine donnant du bromure de bétaine est connue depuis fort longtemps :



Il en est de même de la réaction entre l'acide bromacétique et la monométhylamine donnant du méthylglycocolle ou sarcosine; de la réaction avec la diméthylamine qui donne du diméthylglycocolle.

Tous ces composés sont stables.

Hans Thacher Clarke, dès 1910, a étudié les complexes formés en milieu alcoolique anhydre par les acides monohalogénés et leurs sels avec des bases organiques, entre autre la pyridine; mais cet auteur a uniquement étudié la cinétique de ces réactions.

D'une façon générale, il ressort des études antérieures à la nôtre, que les dérivés monohalogénés de l'acide acétique et, en particulier, le dérivé bromé et le dérivé iodé ont la pro-

priété de bloquer la fonction base organique en donnant des composés stables. Ces études se sont surtout effectuées en milieu alcoolique.

Nous nous sommes proposés de déterminer dans quelles conditions, en solution aqueuse ces complexes se formaient et pouvaient être dosés chimiquement par la méthode que nous venons de décrire. Après un certain nombre d'essais infructueux, nos efforts ont été couronnés de succès dès que nous nous sommes aperçus du rôle primordial joué par le pH de la solution à doser.

Nous nous sommes attachés à étudier un certain nombre de corps aussi caractéristiques que possible.

Les résultats globaux de nos recherches sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU III

**Combinaisons de l'acide bromacétique
et des acides aminés et des bases organiques**

CLASSEMENT CHIMIQUE

Corps étudié		pH de 50 % de combinaison
Bases primaires	Monométhylamine	8,8
	Monoéthylamine	8,5
	Monopropylamine	7,8
Bases secondaires	Diméthylamine	8,0
Bases doubles	Putrescine	7,5 (1)
	Cadavérine	7,4 (1)
Bases tertiaires	Histidine	6,6,
	Strychnine	5,4
Acides aminés	Glycocolle	9,1
	Alanine	7,5
	Arginine	6,6
Diacides monoamines	Acide aspartique	pas de combinaison
	Acide glutamique	8,6
Amide acide aminé	Asparagine	6,2
Dérivés de la guanidine	Créatine	pas de combinaison
	Créatinine	id.
	Guanidine	id.

(1) pH donné par la méthode colorométrique.

Les résultats généraux que nous venons de donner dans le tableau III, nous allons maintenant les étudier en détail pour chacun des corps envisagés et essayer d'en déduire les règles de marche de la combinaison.

1° *Monométhylamine.*

Ainsi que nous l'avons vu, cette réaction était connue depuis un certain nombre d'années. Nous avons simplement précisé les zones de pH de combinaison. Les dosages se sont d'ailleurs révélés assez difficiles et parfois un peu incertains, du fait surtout de l'instabilité de la concentration de la solution en monométhylamine, bien que nous ayons pris la précaution d'employer le chlorure de monométhylamine en solution tampon phosphaté à $\text{pH} = 7,8$.

Les résultats des quelques dosages satisfaisants sont donnés ci-dessous :

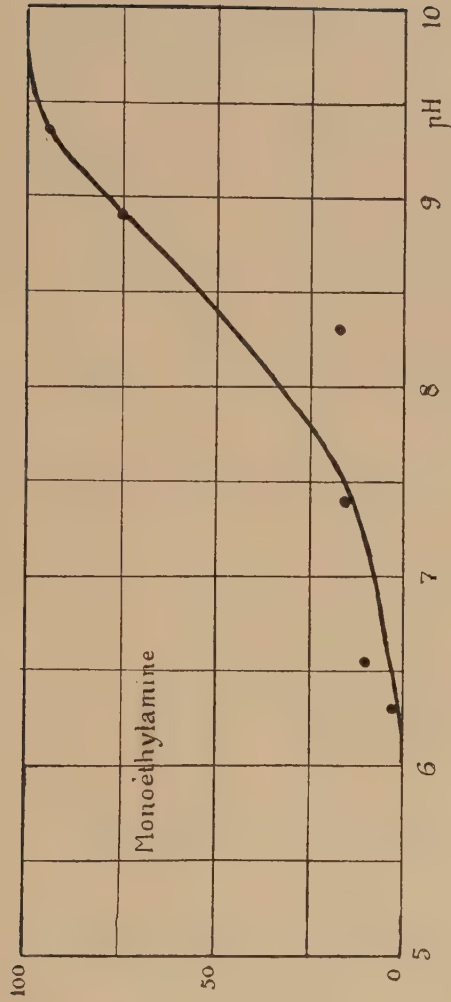
à $\text{pH} = 7,2$	7 % de combinaison
	approximation ± 4 %.
à $\text{pH} = 8,57$	43 % de combinaison
	approximation ± 5 %.
à $\text{pH} = 8,92$	83 % de combinaison
	approximation ± 3 %.
à $\text{pH} = 9,48$	97 % de combinaison
	approximation ± 4 %.

Nous voyons, d'après ceux-ci, que la combinaison est nulle à $\text{pH} = 6,8$ à 7 et que le point de demi-combinaison est aux environs du $\text{pH} = 8,8$, la combinaison n'étant atteinte qu'au delà du $\text{pH} = 9,4$ environ.

2° *Monoéthylamine.*

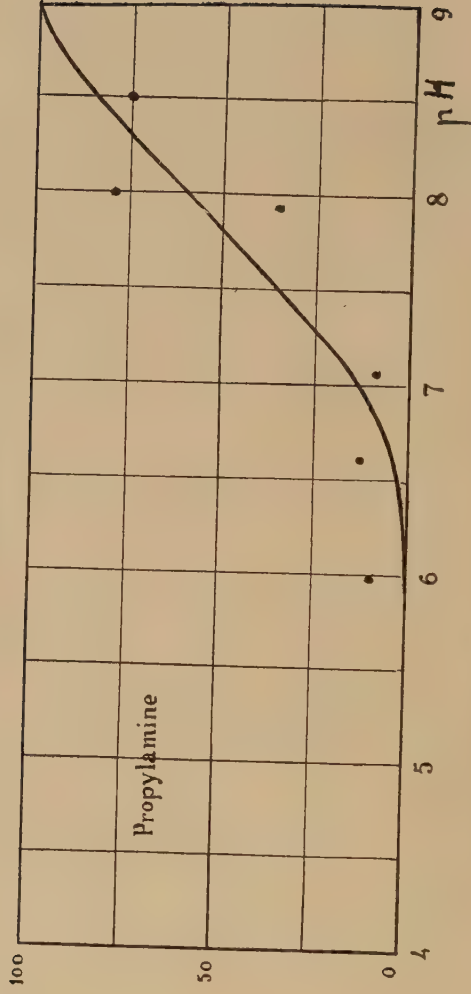
Nous nous sommes servis encore ici, pour les mesures du chlorhydrate de monoéthylamine en solution phosphatée à $\text{pH} = 7,8$. Cette solution, un peu plus stable que la précédente, nous a permis d'obtenir des résultats plus satisfaisants au

FIGURE I



Action du Bromacétate de Na sur la monoéthylamine en fonction du pH
quantité dosable au complexe (en ordonnée).

FIGURE II



Action du Bromacétate sur la mono-propylamine en fonction au pH,
quantité de complexe dosable (en ordonnée).

point de vue dosage. Le début de la formation du complexe se place aux environs de $\text{pH} = 6,9$. Le point de demi-combinaison se place aux environs de $\text{pH} = 8,5$; la combinaison est totale à $\text{pH} = 9,3$.

Reportés sur un graphique, les résultats que nous avons obtenus, nous ont permis de construire la courbe représentative de la marche de la combinaison (fig. 1).

3° Monopropylamine.

Nous avons toujours opéré avec une solution de chlorhydrate de monopropylamine en solution aqueuse phosphatée tamponnée à $\text{pH} = 7,8$ et gardée, comme dans les cas précédents, à la glacière de manière à éviter autant que possible les variations de concentration dues à la décomposition et à l'évaporation du corps. L'étude de la marche de la combinaison a été assez facile, plus que pour la monométhylamine et la monoéthylamine. Il semble que la formation du complexe et sa stabilité soient meilleures.

Les résultats obtenus nous ont permis de construire la courbe (fig. 2) qui montre le début de la combinaison aux environs de $\text{pH} = 6$; le point de demi-combinaison à $\text{pH} = 7,8$ et la combinaison totale à $\text{pH} = 8,8$.

De la comparaison des résultats obtenus avec cette série d'amines simples, nous pouvons déduire :

1° La formation du complexe se fait d'autant mieux, du moins pour les premiers termes de la série des monoamines dérivant des carbures saturés, que le nombre d'atomes de carbone est plus élevé.

2° Le complexe paraît plus stable pour la propylamine que pour l'éthylamine; pour l'éthylamine que pour la méthylamine. Les dosages ont été, par conséquent, plus précis pour l'amine en C_3 que pour les amines plus simples.

3° Le pH auquel se forme le complexe a décru de façon régulière de la monométhylamine à la monopropylamine.

4° *Diméthylamine.*

La diméthylamine a été la seule base secondaire que nous ayons étudiée. Dans ce cas, la formation du complexe s'est poursuivie de façon régulière, molécule à molécule, entre $\text{pH} = 7$ et $\text{pH} = 9,5$; le point de demi-combinaison se situe aux environs de $\text{pH} = 8,0$.

Il semble qu'au delà de $\text{pH} = 9,5$, entre $\text{pH} = 9,6$ et $\text{pH} = 12,2$, une deuxième molécule de bromacétate réagisse avec la molécule de diméthylamine, bloquant ainsi la deuxième fonction base de ce corps.

Nous n'osons affirmer la deuxième partie de ce phénomène, étant donné la difficulté d'obtenir une série de mesures correctes quand on opère pour les dosages au delà de $\text{pH} = 10$.

5° *Putrescine.* (1)

Nous n'avons eu à notre disposition que des petites quantités de putrescine (0 gr. 50 environ) qui ne nous ont pas permis de construire une courbe de combinaison comme pour les corps précédents ; de plus, des résultats obtenus ne le sont qu'avec une moins grande approximation, car le pH des expériences que nous avons faites, a été mesuré à l'aide de la méthode colorimétrique.

Il n'y avait pas combinaison à $\text{pH} = 6$ environ; la zone de demi-combinaison avoisinait $\text{pH} = 7,5$ et la combinaison totale semblait avoir lieu aux environs de $\text{pH} = 8$.

6° *Cadavérine.*

Les résultats obtenus pour la cadavérine se superposent à ceux obtenus pour la putrescine et sont entachés des mêmes causes d'erreur pour les mêmes raisons.

(1) Ces produits nous ont été gracieusement fournis par la Maison Hoffman-H. La Roche, que nous tenons à remercier ici de son amabilité.

A $\text{pH} = 6,4$ il n'y avait pas formation du complexe ; à $\text{pH} = 7,5$, la combinaison était à peu près à moitié et, à $\text{pH} = 8,2$, la combinaison paraissait totale.

7° Glycocolle.

Le complexe qui se forme entre le bromacétate et le glycocolle ne semble pas être très stable et nous n'avons pu le détecter qu'en milieu assez fortement alcalin au delà de $\text{pH} = 9,2$.

Au cours de la réaction dans les conditions de l'expérience, il y a une hydrolyse importante du bromacétate due à la présence des ions basiques dans la solution ainsi que cela a été démontré par nombre d'auteurs.

Les lectures des résultats en deviennent difficiles et ils sont sujets à des causes d'erreurs assez importantes.

Les seules mesures qui nous paraissent être correctes parmi celles que nous avons effectuées nous ont donné les résultats suivants :

A $\text{pH} = 9,82$, il y avait 90 % de combinaison approximation ± 5 ;

A $\text{pH} = 9,28$, il y avait 50 % de combinaison approximation ± 8 ;

A $\text{pH} = 7,33$, il y avait 20 % de combinaison approximation ± 6 ;

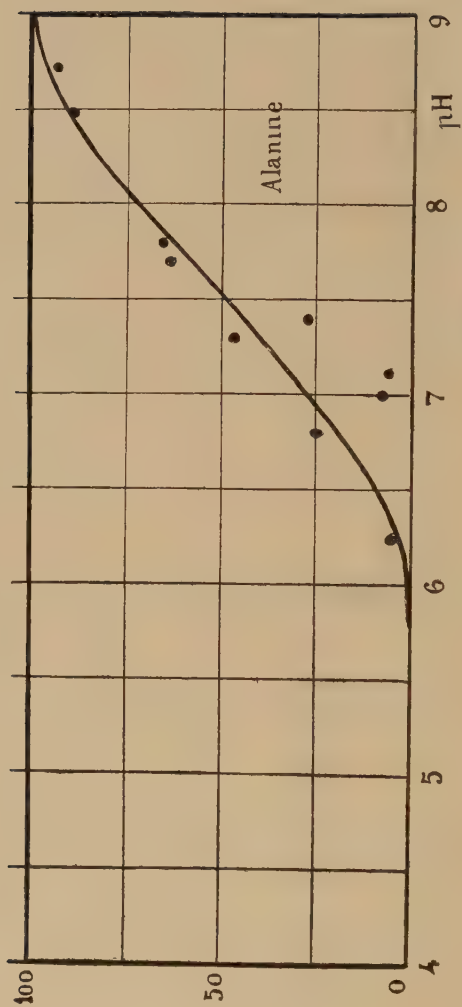
A $\text{pH} = 7,36$, il y avait 21 % de combinaison approximation ± 7 %.

Cette difficulté à obtenir des mesures précises est à rapprocher de la difficulté que nous avons eue à obtenir des résultats corrects avec les autres dérivés des premiers carbures aliphatiques monométhylamine et monoéthylamine.

8° Alanine.

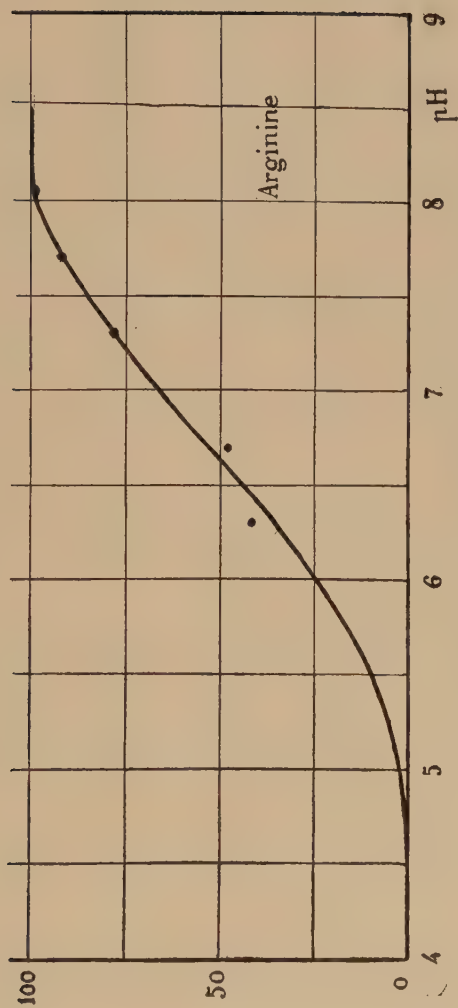
Corps dérivés du propane, l'alanine semble former plus facilement que le glycocolle et à un pH inférieur un complexe avec le bromacétate de soude; les résultats de nos dosages

FIGURE III



Action du Bromacétate sur l'alanine en fonction du pH,
quantité du complexe dosable (en ordonnée).

FIGURE IV



Action du Bromacétate sur l'Arginine en fonction du pH,
quantité du complexe dosable (en ordonnée).

sont plus concordants et nous ont permis de construire la courbe figurée ci-dessous qui nous donne un début de combinaison aux environs de $\text{pH} = 6,2$, une demi-combinaison à $\text{pH} = 7,6$ et une combinaison totale à $\text{pH} = 8,5$ (fig. 3).

9° *Arginine.*

Acide aminé en C⁶, l'arginine a montré une affinité importante pour l'acide bromacétique; la formation du complexe débute légèrement au-dessous de $\text{pH} = 6$; la demi-formation a lieu à $\text{pH} = 6,6$ et la combinaison est totale à $\text{pH} = 7,5$; les dosages ont été faciles et les causes d'erreurs, imputables aux dosages propres, inférieures à 2 %.

La facilité de la formation des complexes entre acide bromacétique et amines simples, ou acides aminés, croît donc régulièrement avec le nombre d'atomes de carbone de leur molécule.

Les résultats obtenus pour l'arginine nous ont permis de construire la courbe figurée (fig. 4):

10° *Asparagine.*

Amide acide aminé, l'asparagine forme un complexe avec le bromacétate déjà en milieu légèrement acide. La combinaison commence à $\text{pH} = 5$; le point de demi-combinaison se place aux environs de $\text{pH} = 6,2$ et la combinaison est totale à $\text{pH} = 7,2$.

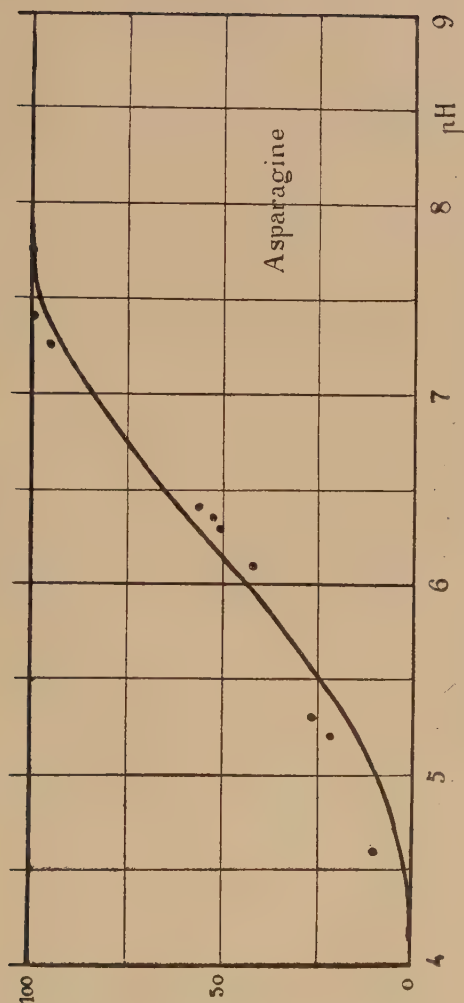
Les résultats obtenus nous ont permis de construire la courbe suivante (fig. 5):

11° *Acide aspartique.*

L'acide aspartique est un acide aminé organique à fonction acide relativement forte.

Nous n'avons pu mettre en évidence la moindre formation de complexe entre lui et le bromacétate de soude et cela entre $\text{pH} = 3$ et $\text{pH} = 12,5$.

FIGURE V



Action du Bromacétate sur l'Asparagine en fonction du pH,
quantité dosable du complexe (en ordonnée).

12° *Acide glutamique.*

Comme le corps précédent, l'acide glutamique présente dans sa molécule deux fonctions acides pour une fonction base aminée, mais c'est un acide moins fort. Aussi, y a-t-il formation de complexe entre lui et le bromacétate en milieu alcalin. Le début de la combinaison se fait en milieu exactement neutre à $\text{pH}=7,14$; le point de demi-combinaison est à $\text{pH}=8,56$ et la combinaison est totale à $\text{pH}=9,45$. Il semble, d'ailleurs, qu'il y ait une augmentation brutale du pourcentage de combinaison aux environs de $\text{pH}=8,5$ tout comme s'il y avait disparition aux environs de ce pH de la fonction acide de ce corps.

Les résultats obtenus nous ont permis de construire le graphique ci-contre (fig. 6).

13° *Dérivés de la guanidine.*

Il semble que les dérivés de la guanidine ne forment pas de complexe avec l'acide bromacétique même dans l'échelle de pH comprise entre $\text{pH}=4$ et $\text{pH}=11$. Nous avons étudié, à ce point de vue, la guanidine base et le chlorhydrate de guanidine, la créatine, la créatinine.

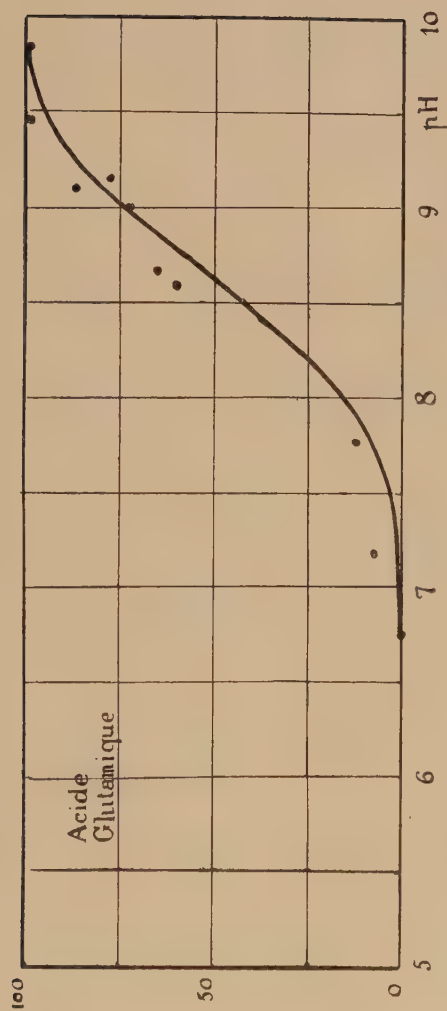
Ces corps existent en très grande quantité dans le bouillon de viande entre autres, dans les bouillons servant de véhicules aux toxines microbiennes; on ne pourra donc pas dire que c'est sur eux que se fixera l'acide bromacétique quand on le fera réagir sur de tels milieux.

14° *Histidine.*

L'histidine est une base organique à formule assez complexe qui, avec l'histamine et le tryptophan semblent être parmi les corps biologiquement les plus actifs; ils sont même entrés dans la thérapeutique journalière de nombreuses maladies.

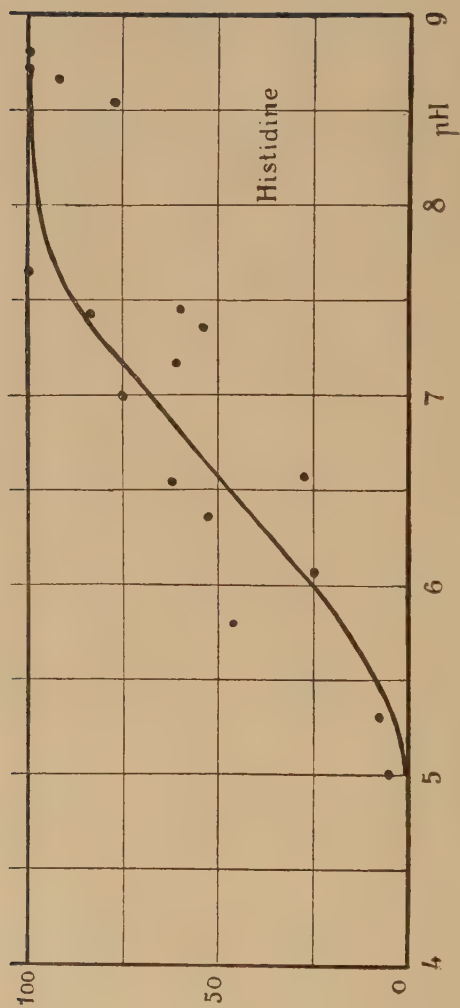
L'histidine forme un complexe avec le bromacétate molécule à molécule et la zone de demi-combinaison se place à $\text{pH}=6,6$. Le complexe est totalement formé à $\text{pH}=7,5$.

FIGURE VI



Action du Bromacétate dans l'acide glutamique en fonction du pH,
quantité dosable du complexe (en ordonnée).

FIGURE VII



Action du Bromacétate sur l'Histidine en fonction du pH,
quantité dosable du complexe (en ordonnée).

La zone de réaction avec le bromacétate se place donc au voisinage immédiat des pH des milieux biologiques.

La courbe ci-dessous résume les mesures que nous avons faites (fig. 7):

15° Nous avons étudié une autre base organique : la *strychnine*.

Les résultats obtenus méritent de retenir spécialement notre attention.

16° *Acides aminés bruts*. (1)

Ainsi que nous venons de le voir, à chaque corps correspond une courbe de combinaison située à un niveau déterminé et différent dans l'échelle des pH.

En présence d'un mélange d'acides aminés, la quantité dosable de ceux-ci devait varier avec le pH.

Dans le but de démontrer cette proposition, nous avons préparé une solution d'acides aminés contenant 80 millimolécules par litre d'acides aminés dosés par la méthode de Sørensen

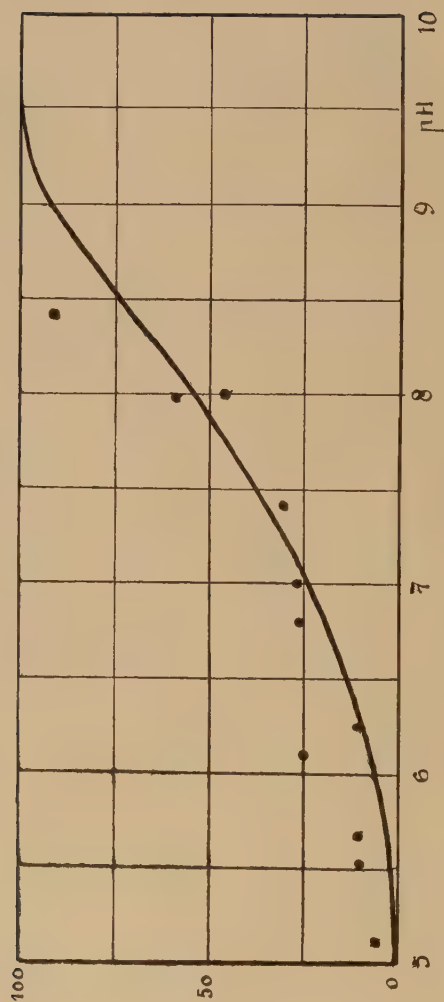
La courbe ci-dessous résume nos résultats (fig. 8):

Elle démontre bien que la quantité dosable d'acides aminés par le bromacétate est éminemment fonction du pH et croît régulièrement avec lui des pH acides vers les pH basiques.

Le mélange contenait principalement de l'alanine, de la leucine et de l'acide glutamique.

(1) Envoyés gracieusement par la Maison Hoffmann-Laroche, au laboratoire de chimie physiologique.

FIGURE VIII



Action du Bromacétate sur une solution d'acides anisés en fonction du pH.
En ordonnée millimolécules/litres dosées sous forme de complexe.

CHAPITRE IV

ETUDE DU COMPLEXE BROMACETATE-STRYCHNINE

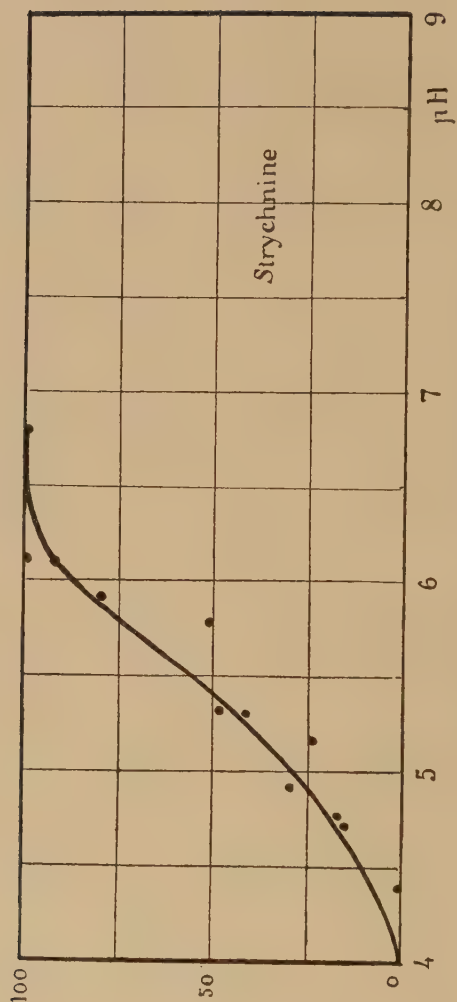
Cette étude du complexe bromacétate strychnine mérite de nous arrêter tout spécialement, car nous avons pu mettre en évidence parallèlement à la formation et à l'isolement d'un nouveau corps chimique, l'apparition de nouvelles propriétés biologiques de ce corps, entre autres la disparition de sa toxicité.

La strychnine peut être considérée comme une base tertiaire avec un seul atome d'azote présentant cette fonction base, dans sa molécule. Elle forme avec le bromacétate de soude un complexe molécule à molécule, avec les acides elle donne des sels monobasiques; la strychnine, base faible, est libérée de ses sels, dès un pH de 9, par le carbonate de Na par exemple. Mais la strychnine, à l'opposé des acides aminés précédemment étudiés, se combine au bromacétate en milieu légèrement acide, dans des conditions où elle est sous forme de sels.

Les résultats que nous avons obtenus ont mis en évidence la formation du complexe à partir de $\text{pH} = 4,20$; le point de demi-combinaison est situé à $\text{pH} = 5,4$; la combinaison est totale à $\text{pH} = 6,5$ environ.

Le tableau ci-dessous et la courbe suivante nous donnent l'aspect du phénomène:

FIGURE IX



Action du Bromacétate sur la Strychnine en fonction du pH.
Quantité % de complexe formée en ordonnée.

Etude de l'Action du Bromacétate de Na

MESURE DE pH					Quantité Bromacétate tubes témoins (micro molé- cules)
Du tampon	Solution au moment de la préparation	Après B. M. à 60°	Après addition CH ₃ COOH	Au moment du dosage	
5,02	4,30	4,17	»	4,02	968
5,02	4,35	4,22	»	4,03	968
5,50	4,72	4,45	»	4,10	960
5,50	4,76	4,32	»	4,00	960
4,60	4,91	4,36	»	4,70	910
4,50	5,17	5,50	»	4,44	920
5,10	5,30	4,24	»	4,70	908
5,40	5,32	4,40	»	4,84	840
5,90	5,80	5,50	»	4,63	910
5,90	5,90	5,60	»	4,82	922
6,25	6,08	5,50	»	4,63	970
6,25	6,10	5,02	»	4,87	965
6,97	6,65	6,20	»	5,24	946
6,97	6,70	6,48	»	5,82	960
8,88	7,50	7,02	5,39	5,34	880
8,88	7,70	7,10	4,98	4,80	880

sur la Strychnine en fonction du pH

Strychnine mise en pré- sence (micro molécules)	Strychnine combinée	Pourcentage	Coefficient d'erreur	Remarques
66	12	18 %	5 %	
60	9	15 %	6 %	
60	13	16 %	6 %	
120	20	17 %	4 %	
66	21	30 %	7 %	
120	28	24 %	5 %	
132	54	41 %	3 %	
66	31	48 %	10 %	
120	62	52 %	6 %	
66	54	81 %	8 %	
120	111	92 %	4 %	
66	68	100 %	5 %	
132	140	100 %	4 %	
66	70	100 %	6 %	
120	110	100 %	8 %	
66	71	100 %	7 %	

On aurait pu nous reprocher de n'avoir jamais isolé un des complexes décrits; nous avons pu réaliser l'isolement du complexe bromacétate-strychnine.

Nous avons procédé de la façon suivante.

Nous sommes partis d'une solution contenant :

Bromacétate de soude sol. N	400 cc.
Sulfate de strychnine, sol. N/30.....	350 cc.
Tampon phosphaté (phosphate disodique M/15)	550 cc.

Nous avons porté ce mélange au bain-marie à 60° pendant une heure; 10 cc. de la solution se révélèrent inoffensifs pour le cobaye de 500 gr.; puis, nous avons évaporé cette solution à siccité au bain-marie à 50° environ et sous pression réduite de 2 à 5 cm. de mercure.

Dans ces conditions, nous avons obtenu, au fond du ballon qui nous a servi à l'évaporation, un résidu blanchâtre adhérent aux parois du verre mal cristallisé et assez fortement hygroscopique.

Ce magma contenait :

Bromacétate de soude;

Phosphate disodique;

Complexe bromacétate strychnine.

Il s'agissait de séparer le complexe formé des deux autres corps et surtout du phosphate disodique. Pour cela, nous nous sommes adressés à la méthode physique des dissolutions fractionnées.

Nous avons d'abord essayé comme solvant le chloroforme, le dichloréthylène, le benzène, l'éther éthylique et, enfin, l'alcool; ces différents solvants ont été utilisés à chaud et à froid.

Le solvant qui nous a donné les meilleurs résultats a été l'alcool éthylique employé à chaud qui nous a permis d'obtenir un corps blanc bien cristallisé et dont les caractères physiques et chimiques ont été les suivants:

Ce corps est soluble dans l'eau et l'alcool éthylique, insoluble dans l'éther éthylique, le chloroforme, le dichlorétylène, Saveur amère.

Il fond vers 285° en commençant à se décomposer aux alentours de 260° .

Il est très déliquescent à l'air.

Au point de vue chimique, il est caractérisé d'une façon générale dans son action avec les réactifs caractéristiques de la strychnine par la lenteur ou la disparition de ces réactions.

Avec le bichromate de potasse en solution sulfurique, alors qu'avec la strychnine l'apparition du précipité jaune caractéristique se fait en quelques minutes, il faut compter plusieurs heures pour que celui-ci se forme avec le complexe bromacéto-strychnine.

Il n'y a pas de formation de précipité, ni avec le nitroprusiate de soude, ni avec le tanin.

Avec l'acide picrique, au lieu du précipité jaune cristallin apparaissant immédiatement avec les sels de strychnine, il faut attendre 24 heures pour voir apparaître quelques amas cristallins blancs jaunâtres adhérents aux parois du tube.

Comme corollaire de l'étude chimique que nous venons de faire, du complexe bromacétate-strychnine, nous avons mis en évidence, par une étude expérimentale sur l'animal, la perte de la toxicité de ce corps nouveau formé, perte de la toxicité qui le rapproche des gènalcaloïdes et, en particulier, de la génostrychnine de L. et M. Polonowski.

Nous sommes partis de solutions identiques à celles qui nous avaient servies pour l'étude chimique de ce corps en ayant soin de nous placer, à des pH compris, entre $\text{pH} = 7$ et $\text{pH} = 7,5$.

Dans ces conditions, nous avons pu injecter à des cobayes dont le poids variait entre 250 et 500 gr., des quantités de complexe, allant jusqu'à 60 milligrammes par kilo, de strychnine modifiée.

Les animaux ont très bien supporté ces injections sans présenter d'autre phénomène observable qu'une légère augmentation du rythme de la respiration et du rythme cardiaque. Des cobayes témoins reçoivent 2 mg. 5 et 3 mg. de la strychnine qui nous avait servi à préparer notre complexe et meurent dans l'espace de quelques minutes.

D'autres cobayes reçoivent un mélange préparé extemporanément, de bromacétate et de sel de strychnine en solution tampon à $\text{pH}=7$ et meurent dans les mêmes conditions que les animaux recevant le sel de strychnine seul, c'est-à-dire dans l'espace de 3 à 10 minutes, en présentant tous les signes classiques de l'empoisonnement par la strychnine. Ces résultats sont consignés dans le détail dans le tableau suivant.

TABLEAU V

**Action de la strychnine
du mélange bromacétate + strychnine
et de la combinaison des deux sur le Cobaye**

Cobayes	Poids en g.	Strychnine pure mg./kg	Strychnine et Bromacétate		Résultat
			non co- binés mg Str./k°	combinés mg Str./k°	
I	72,15	320	2,5		Mort en 5'.
	72,17	410	2,5		Mort en 5'.
	72,16	300	3		Mort en 5'.
	72,18	440	3		Mort en 5'.
II	72,19	230	2,5		Mort en 10'.
	72,20	315	3		Mort en 5'.
	72,21	410	3		Mort en 5'.
	72,22	620	5		Mort en 5'.
III	72,24	300		25	Survie.
	72,25	325		30	Survie.
	72,26	265		35	Survie.
	72,27	345		40	Survie.
	72,28	600		45	Survie.
	72,29	595		50	Survie.
	72,30	372		60	Survie.

Nous avons même injecté à un malade une dose correspondante à un cg. de complexe à plusieurs reprises, sans provoquer aucune sensation désagréable et, avec comme seule action, de faire passer sa tension artérielle à l'oscillomètre de Pachon de T.Mx. = 10 à T.Mx. = 12; la minima dans les deux cas restant égale à 7. Cette augmentation de tension se maintenait environ 3 à 4 heures après l'injection.

Nous avons pu vérifier aussi la non existence et l'existence partielle du complexe.

Partant d'une solution identique à celle de notre première série d'expériences et dont le pH, cette fois-ci, était de 4,25, nous avons injecté une série de cobayes avec la solution, après séjour au bain-marie de celle-ci pendant une heure.

Les quantités injectées variaient de 15 mg. à 2 mg. 5. Les six premières bêtes sont mortes avec les signes classiques de l'empoisonnement par la strychnine, les deux dernières ont survécu, mais après avoir présenté un certain nombre de crises convulsives.

TABLEAU VI

**Action de la Strychnine partiellement combinée
au Bromacétate à pH = 4,25**

Cobayes	Poids	Bromacétate- Strych. mg./K°	Résultat
72,33	280 gr.	30 mg.	Mort.
72,34	330 gr.	15 mg.	Mort.
72,35	225 gr.	12 mg.	Mort.
72,37	420 gr.	9 mg.	Mort.
72,38	520 gr.	6 mg.	Mort.
72,39	265 gr.	4 mg.	Mort.
72,40	400 gr.	3 mg.	Survie après fatigue énorme.
72,41	420 gr.	2 mg. 5	Survie après fatigue énorme.

A pH=4,20, la toxicité du mélange était presque totalement conservée; à peine y avait-il augmentation légère de la dose toxique minima.

Dans une troisième série d'expériences, nous plaçant cette fois-ci à pH=5,8; nous avons injecté, toujours dans les mêmes conditions, une série de 10 cobayes et nous avons trouvé que à ce pH la dose toxique du complexe était comprise entre 15 et 20 milligrammes.

Ces résultats sont consignés dans le tableau ci-après.

TABLEAU VII

Cobayes	Poids	Strychnine pure Mg Kg	Mg Strychnine + bromacétate Mg kilo	Résultats
72-42	340		5	Survit.
72-43	420		5	Survit.
72-44	240		10	Survit.
72-45	310		10	Survit.
72-46	520		15	Survit très fatigué.
72-47	415		15	Survit très fatigué.
72-48	325		18	Survit très fatigué.
72-49	400		18	Mort.
72-50	550		20	Mort.
72-51	420		25	Mort.
72-53	350	2,5		Mort.
72-54	300	3,00		Mort.

Ainsi donc, la toxicité disparaît au fur et à mesure que se forme le complexe bromacéto-strychnine, et tout se passe comme si, seule, la strychnine libre avait un pouvoir toxique décelable aux quantités employées.

Nous avons aussi contrôlé s'il y avait disparition de la toxicité du complexe extrait par l'alcool et recristallisé par cristallisation fractionnée.

Nous nous sommes aperçus que celui-ci était dépourvu de toute toxicité vis-à-vis du cobaye et cela même à la dose de 250 milligrammes par kilo.

Pour contrôler qu'aucune partie toxique n'était restée dans la partie insoluble dans l'alcool, nous en avons injecté à un animal témoin 150 milligrammes par kilo, sans avoir de troubles chez celui-ci. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU VIII

Cobayes	Poids	Bromaceto strychnine Mg/K°	Résidu mg.K°	Résultat
47-0	480 gr.	20		Survie.
47-1	510 gr.	50		Survie.
47-2	615 gr.	100		Survie.
47-3	425 gr.	175		Survie.
47-4	580 gr.	250		Survie.
47-5	450 gr.		150	Survie.
47-6	620 gr.		145	Survie.

Il y a donc au moins, au point de vue pharmacodynamique et toxicité, un parallèle à établir entre le complexe bromacéto-strychnine et la génostrychnine ou N - oxyde de strychnine.

Polonowski, à la suite de Pictet et Mattison interprète la perte de toxicité du N - oxyde de strychnine au fait que la fonction base de la strychnine était bloquée par un atome d'oxygène réalisant ainsi, à la place du groupement aminé, le groupement N = O qui, lui, est dépourvu de toute toxicité.

Dans notre cas, on peut admettre que l'ion $\text{CH}_2 \text{Br COO}$ se fixe lui aussi sur le radical aminé, le bloque et, partant, fait disparaître la plus grande partie de la toxicité de la strychnine. Nous avons donc à faire à un radical détoxifiant du type

de ceux décrits par Launoy, dans son livre récent sur les fonctions toxiques.

Cet auteur a bien réuni et mis en évidence de façon systématique l'importance de ces radicaux généralement simples qui vont se fixer sur des molécules plus ou moins complexes et changer totalement leurs propriétés toxiques faisant disparaître ou tout au moins diminuer dans des proportions énormes ce pouvoir.

A l'opposé d'ailleurs, il existe des radicaux qui exaltent la toxicité de certains corps chimiques et même des toxines (Legroux et Ramon).

CHAPITRE V

ACTION DE L'ACIDE BROMACETIQUE SUR LA TOXINE DIPHTERIQUE

§ 1. — Historique

Nous venons de voir le rôle détoxiquant joué par le bromacétate dans la neutralisation de la strychnine.

Ce rôle, nous allons le retrouver à nouveau dans la combinaison bromacétate-toxine diphtérique.

Si la toxine diphtérique est connue depuis plus d'un demi-siècle, si on a séparé l'exotoxine plus active et plus étudiée de l'endotoxine obtenue par lyse des bacilles diphtériques, on n'est guère plus avancé dans la connaissance de sa constitution chimique qu'à l'époque où Roux la décrivit pour la première fois.

On l'a d'abord considérée comme une toxalbumine appartenant au groupe des sérum albumines (Bruger et Frankel), puis comme une nucléalbumine (Gamaleïa), mais, par purification de la toxine tant par les procédés physiques (précipitation, adsorption, osmose) que chimiques (action des acides, du chlorure ferrique), on est arrivé à obtenir des produits toxiques n'ayant plus les caractères d'une albumine.

Roux et Yersin ont attiré dès 1890 l'attention des chercheurs sur les analogies qui existaient entre la toxine diphtérique et

les ferments (influence destructive de la chaleur, adsorption facile par les précipités).

Plus récemment, Koulikoff et Smirkoff, dans une série de recherches, ont essayé d'analyser les propriétés chimiques fondamentales de la toxine diphtérique.

Ils ont cru trouver un point isoélectrique de la toxine aux environs de $\text{pH} = 4,8$ non sans analogie avec les points isoélectriques des acides aminés (Michaelis et Davidsohn) et d'un grand nombre de protéines (Loeb, Northrop).

Ils ont pu arriver à purifier la toxine diphtérique, de telle façon qu'une quantité de 0 gr. 000.000.28 était mortelle pour le cobaye.

On a cherché à neutraliser la toxine diphtérique tant chez les êtres vivants que *in vitro*, puis, d'autre part, à développer chez des sujets réceptifs à l'intoxication diphtérique un état de résistance par l'apparition de corps immunisants.

A l'heure actuelle, ces problèmes présentent des solutions pratiques.

La neutralisation de la toxine diphtérique dans les organismes vivants est réalisée par la sérothérapie.

La neutralisation de cette même toxine est réalisée *in vitro* par l'adjonction d'antitoxine ou par celle de certains corps chimiques.

L'immunisation des sujets réceptifs se fait grâce à la vaccination antidiphtérique qui peut être réalisée de trois façons principales :

1° Par l'injection d'un mélange exactement neutralisé de toxine et d'antitoxine (méthode la plus ancienne);

2° Par l'injection d'anatoxine (méthode de Ramon);

3° Par l'injection répétée de cryptotoxine (méthode de Vincent).

La sérothérapie antidiphtérique est une méthode trop universellement connue pour que nous y insistions. Rappelons seulement que le sérum antidiphtérique, tel que le prépare

couramment l'Institut Pasteur, n'est pas antimicrobien, mais uniquement antitoxique. Il ne s'adresse, de plus, qu'à la neutralisation de l'exotoxine du bacille de Loeffler et semble très peu actif vis-à-vis de l'endotoxine ou des endotoxines.

La neutralisation *in vitro* de la toxine diphtérique a été tout d'abord réalisée par l'addition d'antitoxine.

La neutralisation d'une toxine par une antitoxine peut se faire d'une manière différente, avec des doses variables suivant que l'on ajoute l'antitoxine en une ou plusieurs fois, suivant aussi que la toxine employée est une toxine préparée récemment ou une toxine vieillie.

Aussi, faut-il toujours suivre dans une série d'expériences un protocole bien défini si l'on veut avoir des résultats comparables.

Plusieurs théories, trois principalement, ont cherché à donner une explication rationnelle de ce phénomène :

1° Théorie d'*Ehrlich*.

La plus ancienne et aussi la plus compliquée.

2° Théorie d'*Arrhénius et Madsen*.

Pour ces auteurs, il y aurait analogie dans la formation du complexe toxine et antitoxine avec la réaction qui se passe entre un acide faible et une base faible.

3° Théorie de *Bordet*.

Cet auteur admet une composition variable du complexe toxine-antitoxine.

Tout se passerait comme s'il s'agissait de phénomènes physiques d'adsorption et de floculation colloïdale.

Les biologistes ont une tendance à admettre plutôt cette dernière théorie qui rapproche le phénomène de neutralisation de la toxine par l'antitoxine d'un grand nombre d'autres phénomènes biologiques d'immunologie.

On a cherché, ensuite, à neutraliser des toxines par des corps chimiques. D'aucuns, Nélis par exemple, ont voulu voir dans certains sels (sel de quinine) injectés, une action pro-

tectrice chez les animaux contre la toxicité de ces poisons; leurs expériences sont loin d'être convaincantes.

Par contre, il est possible de rendre atoxique dans certaines conditions la toxine diphtérique et d'autres toxines par l'adjonction de petites quantités de corps chimiques; dans un certain nombre de cas, les corps ainsi obtenus ont une valeur variable comme antigène.

Vincent, Ramon, Nélis, Schmidt et leurs collaborateurs ont étudié un grand nombre de corps et analysé avec leurs élèves l'action de ceux-ci sur la toxine diphtérique tant au point de vue pouvoir destructif simple de celle-ci qu'au point de vue pouvoir détoxiquant propre.

Koullkoff et Smirnoff (1927) classent les corps neutralisants de la toxine diphtérique en deux groupes principaux:

a) Substances exerçant une action chimique sur le groupe actif de la toxine; ils assimilent déjà la toxine à une base organique faible;

b) Substance exerçant une action physico-chimique dans laquelle la neutralisation de la toxine résulte de l'effet des ions H ou OH. Ces ions neutralisent dans une zone donnée la toxine en la précipitant; ce processus peut être réversible ou irréversible suivant la température et l'intensité de l'action des ions. Le cas le plus simple de ce mécanisme est la précipitation de la toxine du côté acide de son point isoélectrique par les acides dilués

L'analogie, d'une part, avec les bases organiques faibles, d'autre part, avec les ferments, nous a amené à étudier l'action des bromacétates sur les toxines.

Grâce à l'amabilité de MM. les Professeurs Dubreuil et Aubertin, directeur et sous-directeur de l'Institut Pasteur de Bordeaux, nous avons pu avoir à notre disposition une quantité suffisante de toxine diphtérique pour mener à bien cette étude. Nous avons recherché la toxicité du produit traité, sa valeur antigénique déterminée par la méthode expérimentale sur l'animal et par la méthode floculation de Ramon.

Enfin, dans une série d'expériences *in vitro*, nous avons essayé de déterminer la quantité d'acide bromacétique fixée par la toxine en bouillon à différents pH et comparé la toxicité des différents produits obtenus à la quantité d'acide bromacétique fixée.

Avant d'entrer dans le détail des expériences, nous allons rappeler dans un tableau quels sont les corps principaux dont l'action sur la toxine diphtérique a été étudiée et quels ont été les résultats obtenus par les différents auteurs qui se sont attachés à cette besogne.

Composés minéraux (1) :

Permanganate de potasse (Schumacher)	Destruction.
Persulfate de potasse (Schumacher)	id.
Chlorure de sodium (Schmidt)	Sans action.
Fluorure de sodium (Schmidt)	id.
Iodate de sodium (Schmidt)	id.
Sulfate de sodium (Schmidt)	id.
Hypophosphite de soude (Schmidt)	id.
Formiate de soude (Schmidt)	id.
Acétate de soude (Schmidt)	id.
Sulccinate de soude (Schmidt)	id.
Tartrate de soude (Schmidt)	id.
Iodure de sodium (Schmidt)	Diminution action floculante
Azotite de soude (Schmidt)	Destruction de la toxine en 7 jours
Bromate de sodium (Schmidt)	id.
Sulfocyanate de soude (Schmidt)	id.
Perchlorate de soude (Schmidt)	id.

(1) Tous ces corps sont employés à la concentration N/10 sauf indications contraires.

Pyrophosphate de soude	id
(Schmidt)	
Orthophosphate de soude	Sans action.
(Schmidt)	
Métaphosphate de soude	id.
(Schmidt)	
Glycérophosphate de soude	id.
(Schmidt)	

Carbure d'hydrogène et dérivés halogénés (d'après Schmidt) :

Pentane	Inactif sur la toxine.
Hexane	id.
Heptane	id.
Octane	id.
Nonane	id.
Paraffine solide (F = 43°)	id.
Amylène	id.
Trichlorométhane	Destruction : une semaine.
Dichloréthylène	id.
Trichloréthylène	Destruction un peu moins rapide.
Tétrachlorométhane	Inactif.
Tribromométhane	Destruction 90 % en une semaine.
Dibromure d'éthyle	Destruction 20 % antigène en un mois.
Monoiodure de méthane	Destruction assez prononcée.
Diodure de méthane	Presque sans action.
Triiodure de méthane	Inactif.
Monoiodoéthane	20 % pouvoir antigène 1 semaine.

Alcools monovalents primaires (d'après Schmidt) :

Alcool méthylique	Sans action.
Alcool éthylique	id.
Alcool propylique	id.
Alcool butylique	id.
Alcool iso-butylique	id.

Alcool amylique	Destruction totale : 1 mois.
Alcool hexylique	Destruction totale : 1 semaine.
Alcool heptylique	Destruction 36 % : 1 mois.
Alcool opylique	Destruction 42 % : 1 mois.
Alcool nonylique	Sans action.
Alcool cétylique	id.
Alcool décylique	id.

Alcools non saturés (Schmidt) :

Alcool allylique	Sans action.
------------------	--------------

Ethers oxides :

Ether éthylique	Destruction en une semaine.
-----------------	-----------------------------

Esters :

Acétate d'éthyle	Destruction en 1 mois 10 % pouvoir antigène.
Ester acétylacétique	

Cétones (Schmidt) :

Acétone	Sans action.
Méthyl-éthyl-cétone	Destruction 10 % pouvoir antigène en un mois.

Aldéhydes (Ramon, Berthelot et Ramon, Schmidt) :

Formol	Produit type servant à la transformation en anatoxine.
Aldéhyde acétique	Action moins forte et moins complète que la précédente.
Aldéhyde propylique	Destruction 75 % pouvoir antigène, toxicité relativement conservée.
Aldéhyde butylique	Destruction 20 à 30 % pouvoir antigène.
Aldéhyde amylique	id.

Aldéhyde hexylique	id.
Aldéhyde heptylique	id.
Aldéhyde octylique	id.
Aldéhyde nonylique	Sans action.
Aldéhyde décylque	id.
Paraldéhyde	Sans action nette.
Dialdéhyde-glyoxal	Action comparable au formol.
Trichloraldéhyde	Destruction totale en un mois.
Butylchloral	id.
Méthylal	Sans action.

Oses (Schmidt) :

Arabinose	Sans action.
Xylose	id.
Glucose	id.
Fructose	id.
Galactose	Destruction 15 % pouvoir anti- gène 1 mois.

Acides organiques aliphatiques (Schmidt) :

Acide acétique	Inactif à N/10.
Acide formique	id.
Acide propylique	id.
Acide butyrique	id.
Acide valérianique	id.
Acide caproïque	id.
Acide œnantique	Destruction 50 % 1 mois.
Acide caprylique	Destruction totale 1 sem. à N/10.
Acide pelargonique	id.
Acide caprique	Destruction 10 % pouvoir antigène N/1.000 un mois, à N/100 destruction totale une semaine.

Dérivés halogénés des acides (Schmidt, Ramon) :

Acide Monochloracétique	Inactif N/10.
Acide dichloracétique	id.

Acide trichloracétique	Destruction 50 % pouvoir anti- gène un mois à N/10.
------------------------	--

Acides dibasiques (Schmidt) :

Acide oxalique	Inactif.
Acide malonique	id.
Acide succinique	id.

Acides-alcools (Schmidt) :

Acides maliques (d—, l—, inactif)	Sans action.
Acides tartriques (d—, l—, inactif)	id.
Acide citrique	id.

Acides non saturés (Schmidt) :

Acide fumarique	Sans action.
Acide maléinique	id.
Acide oléique	Destruction N/100 une semaine.
Acide ricinoléique	id.

Amines (Schmidt) :

Monométhylamine	Inactif.
Diéthylamine	id.
Triéthylamine	id.
Hexaméthylènetétramine	Légèrement actif (formol ?).
Hydroxylamine	Inactif.
Tétraméthylènediamine	id.
Pentaméthylènediamine	id.

Acides aminés (Schmidt) :

Alanine	Inactif.
Nor-leucine	id.
Leucine racémique	id.

Valine	Très léger pouvoir destructeur.
Acide amino-succinique	Inactif.
Acide glutamique	Destruction 15 % en un mois.
Taurine	Inactif.

Amides (Schmidt) :

Urée	Inactif.
Uréthane	N/10 inactif, N destruction 1 semaine.

CORPS A ACTIONS CRYPTOTOXIQUES:

Corps étudiés d'après Vincent et ses élèves.

A : *Acides gras*.

Les plus actifs sont ceux de C_{11} à C_8 qu'ils soient saturés ou non.

B : *Acides aromatiques*.

Phénylacétique.
Benzoïque.
Vanilique.
Phényléthylacétique.
Salicylique.
2-4 Diméthylphénylacétique.
Phénylbutylacétique.
Diiodosalicylique.
Salicyl-salicylique.
Roténique.
Monoiodoroténique.
 α oxy-naphtoïque.

D'une façon générale, l'action des corps chimiques que nous venons d'énumérer peut se faire sur les toxines de trois façons différentes pour les auteurs classiques :

I. — L'action de certaines aldéhydes (Berthelot et Ramon)

et de quelques autres corps, Iode (Nélis), qui transformeraient les toxines en anatoxines, corps nouveaux, essentiellement caractérisés pour l'école de Ramon par :

- 1° La perte totale de la toxicité;
- 2° La conservation à peu près intégrale du pouvoir flocculant;
- 3° Une haute valeur antigénique.

II. — L'action des corps dits « cryptotoxiques » (Vincent). Cette catégorie n'est pas admise par tous les auteurs. Leur action, d'après Vincent, est caractérisée par :

- 1° La disparition de la toxicité, disparition plus ou moins rapide (de 1/4 d'heure à 15 jours);
- 2° Disparition presque totale du pouvoir flocculant;
- 3° La conservation d'une valeur antigénique appréciable.

III. — Les autres corps, ou n'exercent aucune action sur la toxine, ou la détruisent totalement avec perte de toutes les propriétés propres à la toxine envisagée.

Ramon et ses élèves ont insisté sur l'énorme importance de la réaction de flocculation qu'ils ont décrite entre les toxines et anatoxines avec les antitoxines correspondantes. Ils ont voulu établir un parallèle exact entre la valeur antigénique des anatoxines, l'activité toxique des toxines et leur pouvoir flocculant avec les antitoxines.

Ramon, Schmidt en sont arrivés à préférer et à déclarer plus exacte la mesure par le pouvoir flocculant de la valeur antigénique des anatoxines que leur mesure expérimentale par l'immunité provoquée à l'aide d'injections chez l'animal d'expérimentation.

Les cryptotoxines ne se différencieraient pas pour Schmidt des toxines détruites par les produits chimiques ordinaires, surtout parce qu'elles ont perdu tout pouvoir flocculant.

§ 2. — Action du bromacétate sur la toxine diphtérique

I. — Conditions de neutralisation

Nos recherches sur l'action du bromacétate de soude sur la toxine diphtérique nous ont amenés à une conception un peu différente de l'idée classique que nous venons d'exposer.

Nous avons opéré sur des toxines 139 A 2 et 148 A 2 mises gracieusement à notre disposition par l'Institut Pasteur de Bordeaux et titrant :

La première, 14 unités flocculantes;

La deuxième, 11 unités flocculantes.

Elles tuaient respectivement le cobaye de 250 gr. au moment de leur emploi au 1/1.500 et au 1/1.000 de cc.

Comme pour la strychnine et les autres corps que nous avons étudiés, nous nous sommes rendus compte que la combinaison entre la toxine diphtérique en bouillon et le bromacétate de soude était fonction du temps de contact et du pH du milieu :

En fonction du temps à 37° (cette température ne devant pas être dépassée pour ne pas altérer de façon notable la toxine), nous avons prouvé que la toxine fixait une quantité de bromacétate de soude exprimée en millimolécules par litre égales à :

Au bout de 24 heures : 5 millimolécules;

Au bout de 48 heures : 7,5 millimolécules;

Au bout de 3 jours : 14 millimolécules;

Au bout de 5 jours : 13,8 millimolécules;

Au bout de 7 jours, 14,2 millimolécules;

Ainsi, la quantité de bromacétate fixée par la toxine atteint un maximum au bout de 3 jours à 37° et reste sensiblement constante au delà dans le temps.

Ces expériences ont été faites sur la toxine 139 A 2 à un pH = 7,2.

En fonction du pH nous avons étudié la variation de la quantité de bromacétate fixé par la toxine 148 A2; les flacons ont été placés 3 jours à l'étuve à 37°. Nous avons trouvé :

pH=5,60 — 5,13	6,	millimolécules	par litre.
pH=5,63 — 5,40	7,65	»	»
pH=6,36 — 6,30	10,5	»	»
pH=7,69 — 7,40	17,4	»	»
pH=8,42 — 8,04	16,8	»	»

La quantité d'acide bromacétique fixée par le bouillon contenant la toxine diphtérique croît donc régulièrement avec le pH et la quantité maximum fixée semble atteinte dès que le milieu atteint sensiblement la neutralité.

Tout comme pour obtenir avec un corps chimique une combinaison de façon correcte, il fallait un léger excès de bromacétate de soude; dans le cas de la toxine diphtérique, il faut un excès de bromacétate pour obtenir une neutralisation de la toxine.

L'expérience suivante nous l'a prouvé:

Un flacon de toxine 148 A2 de 120 cc. est mis à l'étuve après qu'on lui a eu ajouté une quantité de bromacétate égale à 20 millimolécules par litre. Ce flacon est laissé à l'étuve 3 jours. Une série de 6 cobayes reçoivent cette toxine à des doses variant de 2 à 100 doses mortelles; les résultats obtenus sont les suivants :

TABLEAU IX

Cobayes	Poids	Dose Toxine + 20mM Brom.	Résultats
48-50	410 gr.	2 D. M.	Survie
48-51	445 gr.	5 D. M.	Mort au 5 ^e jour
48-52	555 gr.	10 D. M.	Survit paralysie transitoire
48-53	390 gr.	20 D. M.	Mort
48-54	540 gr.	50 D. M.	Mort 3 ^e jour
48-54	620 gr.	100 D. M.	Mort 36 heures

Le pH de la solution employée était égal à 7,3.

Il n'y avait donc qu'une très faible détoxication de la toxine, et des dosages chimiques pratiqués concurremment ont montré qu'il n'existait plus de bromacétate de soude à l'état libre dans le bouillon toxique après le passage de l'étuve. Ces expériences chimiques montrent que la formation du complexe bromacétate-toxine est régi par des lois analogues au point de vue pH, temps et quantité de corps mis en présence, à celles régissant la formation des complexes entre bromacétate et acides animés et bases organiques.

Les expériences que nous avons faites sur l'animal nous ont tout d'abord montré que la détoxication de la toxine diphtérique était essentiellement fonction de la quantité d'acide bromacétique fixée par le bouillon toxique; elle dépend du temps et du pH du milieu.

Nous avons injecté à des cobayes une quantité de toxine égale à 2 D.M. provenant des 5 flacons que nous avons mis à l'étuve et dans lesquels nous avons dosé la quantité de bromacétate dissimulé. Les résultats obtenus ont été les suivants:

TABLEAU X

Cobayes	Poids	Toxine injectée	Acide bromacétique combiné	Résultats
72-25	325 gr.	2 D. M.	6	Mort
72-26	345 gr.	id.	»	Mort
72-27	345 gr.	2 D. M.	7,65	Mort
72-40	400 gr.	id.	»	Survit paralysie transitoire
72-41	420 gr.	2 D. M.	10,5	Survie
72-28	600 gr.	id.	»	Survie
72-42	340 gr.	2 D. M.	17,4	Survie
72-43	420 gr.	id.	»	Survie
72-47	415 gr.	2 D. M.	16,8	Survie
72-48	325 gr.	id.	»	Survie

La détoxication était donc bien parallèle à la fixation de l'acide bromacétique sur la toxine diphtérique.

Nous avons alors complété l'expérience précédente en injectant des doses croissantes de toxine diphtérique additionnée de bromacétate (45 millimolécules par litre) ayant séjourné à l'étuve 3 et 5 jours. Le pH de la solution avoisinait 9; la toxine employée était la 139 A2.

Les résultats expérimentaux sont consignés dans le tableau suivant :

15 - 20 Mars Action toxine diphtérique 139 A₂ + Bromacétate 40
milli-molécules par litre pH = 9 Etuve à 37° — 3 jours et 5 jours.

TABLEAU XI

Cobayes	Poids	Témoins Toxine pure	Toxine + Bromacétate 3 jours à 37°	Toxine + Bromacétate 3 jours à 37°	Résultats
72-98	370	1/2000			Survit.
72-99	380	1/1500			Mort.
46-D	370	1/100			Mort.
46-2	340		1/1000		Survit.
46-3	520		1/1000		Survit.
46-4	410		1/500		Survit.
46-5	540		1/500		»
46-6	330		1/100		»
46-8	425		1/100		»
46-9	310		1/10		»
46-10	245		1/10		»
46-11	410		1 cc.		»
46-12	520		1 cc.		»
46-13	280		2 cc.		»
46-15	415		2 cc.		»
46-16	265		5 cc.		Survit - Chute poil niveau piqure
46-17	610		5 cc.		Survit.
46-18	315			1/500	
46-19	280			1/500	
46-20	300			1/100	
46-21	410			1/100	
46-22	410			1/10	Survit.
46-23	310			1/10	»
46-24	245			1 cc.	»
46-25	275			1 cc.	»
46-26	510			2 cc.	»
46-27	490			2 cc.	»
46-28	610			5 cc.	Mort au 5 ^e jour
46-29	515			5 cc.	Survit.

Nous nous sommes donc rendus compte que le produit toxine diphtérique + bromacétate n'entraînait pas la mort des cobayes, même aux doses de 5 cc., soit environ 7.500 D.M. Nous avons bien un produit ayant perdu toute toxicité.

Nous avons fait maintenant varier le pH du milieu où se produisait la formation du complexe bromacétate toxine.

Dans une nouvelle série d'expériences nous nous sommes placés à pH = 6,8. Dans ce cas-là nous avons obtenu une limite de la toxicité à 2.000 D.M. environ. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-contre:

15 Octobre 1935

Toxine + ABr Na 60 milli molécules par litre
3 jours étuve à 37° pH = 6,8.

TABLEAU XII

	Poids	Toxine témoin	Tose + A Br	Résultats
48,1	470		1 cc.	Mort 6° jour.
48,2	410		1 cc.	
48,3	490		1 cc.	
48,4	500		1 cc.	
48,5	340		1 cc.	
48,6	380		1 cc.	
48,7	310		2 cc.	Mort accidentelle 4° jour.
48,9	400		2 cc.	
48,10	470		2 cc.	
48,11	620		2 cc.	
48,12	660		2 cc.	
48,13	620		5 cc.	Mort choc 1/4 après inject.
48,14	370		5 cc.	Mort choc 1/4 après inject.
48,15	300		5 cc.	Mort en 36 heures.
48,16	250		5 cc.	Mort en 36 heures.
48,17	430		5 cc.	Mort en 36 heures.
48,18	470			Mort choc 1/4 après inject.
48,19	270	1/1.000		Mort 36 heures.
48,20	260	1/750		Mort 36 heures.
48,21	370	1/700		Mort 36 heures.

A pH = 5,8, il n'y avait aucune neutralisation de la toxine et tous les cobayes que nous avons injectés sont morts en présentant les signes classiques de l'intoxication diphtérique:

TABLEAU XIII

Cobayes	Poids	Toxine + Brom. pH = 5,8 D.M.	Résultats
48-40	245 gr.	2 D. M.	Mort
48-41	645 gr.	2 D. M.	id.
48-42	715 gr.	5 D. M.	id.
48-43	455 gr.	10 D. M.	id.
48-44	245 gr.	20 D. M.	id.
48-45	575 gr.	50 D. M.	id.
48-46	650 gr.	100 D. M.	id.
48-47	380 gr.	500 D. M.	id.
48-49	780 gr.	1000 D. M.	id.

A pH = 6,4 nous avons obtenu une limite mortelle aux environs de 500 à 1.000 D.M. comme en font foi les résultats suivants :

TABLEAU XIV

Cobayes	Poids	Toxine	Toxine Bromacétate	Résultats
46-46	380	2 D.M.		Mort 36 h
46-48	350	4 D.M.		Mort 48 h
46-57	320		2 D.M. (pH=6,2)	Survie.
46-44	480		5 D.M. »	»
48-3	400		10 D.M. »	»
46-47	280		20 D.M. »	»
46-43	310		50 D.M. »	»
46-52	440		100 D.M. »	»
46-49	470		200 D.M. »	»
47-1	510		500 D.M. »	»
46-45	460		2 D.M. (pH=6,4)	»
46-50	460		5 D.M. »	»
46-51	710		10 D.M. »	»
47-0	760		20 D.M. »	»
46-54	760		20 D.M. »	»
46-56	650		100 D.M. »	»
46-55	750		200 D.M. »	»
46-58	750		500 D.M. »	»
46-53	580		1.000 D.M. »	»

Une autre série d'expériences à pH = 5,6 confirme l'absence de détoxication de la toxine à ce pH.

Action du Bromacétate sur la toxine diphtérique à pH = 5

Cobayes	Poids	Témoins I Étuve 5 jours	Toxine A Br Na 3 jours à 37
72-60	410	1/1000 cc.	
72-61	380	1/1000 cc.	
72-62	420	1/900 cc.	
72-63	820	1/900 cc.	
72-64	440	1/800 cc.	
72-66	310	1/700 cc.	
72-67	465		1/1000
72-68	330		1/1000
72-69	410		1/900
72-70	375		1/900
72-71	290		1/800
72-72	275		1/800
72-73	280		1/600
72-74	290		1/500
72-75	340		1/200
72-76	785		1/200
72-77	690		1/200
72-78	525		1/100
72-79	660		1/100
72-80	520		1/10
72-81	800		1/10
72-82	750		1 cc.
72-83	590		1 cc.
72-84	560		
72-85	750		
72-82	920		
72-88	430		
72-89	410		
72-90	340		
72-91	430		
72-92	500		
72-93	320		
72-94	380		
72-95	270		
72-96	410		
72-97	320		

séjour à l'étuve 3 et 5 jours - 45 milli-molécules/litre

Toxine A Br Na 5 jours à 37	Résultats	Remarques
»	Mort en 48 heures.	
»	Survit très fatigué.	
»	Mort 3 jours.	
»	Mort 2 jours.	
»	Mort 36 heures.	
»	Mort 36 heures.	
»	Survit fatigué.	
»	Survit.	
»	Mort.	4 jours.
»	Survit.	Très fat., maigrit.
»	Mort.	4 jours.
»	»	2 jours.
»	»	2 jours.
»	»	36 heures.
»	»	2 jours.
»	»	2 jours.
»	»	2 jours.
»	»	36 heures.
»	»	36 heures.
»	»	36 heures.
»	Mort.	2 jours.
»	Mort.	36 heures.
»	Mort.	36 heures.
1/1000	Survit.	»
1/1000	Survit.	»
1/900	Survit.	Très fatigué.
1/900	Mort.	4 jours.
1/800	Mort.	3 jours.
1/700	»	4 jours.
1/300	»	2 jours.
1/250	»	2 jours.
1/100	»	36 heures.
1/10	»	36 heures.
1/10	»	2 jours.
1 cc.	»	36 heures.
2 cc.	»	36 heures.

Comme dans le cas de la strychnine, nous voyons donc que le rôle détoxiquant du bromacétate de soude est parallèle avec sa combinaison ou sa dissimulation dans le milieu bouillon toxique et fonction du pH.

Le corps obtenu (complexe bromacéto-toxine) était donc totalement dépourvu de toxicité en milieu sensiblement neutre.

Allait-il rentrer dans une des classes de toxines modifiées que nous avons énumérées plus haut? Pour cela, il fallait rechercher les propriétés caractéristiques d'une anatoxine ou d'une cryptotoxine.

Avant d'envisager ce côté biologique, qu'il nous soit permis d'effectuer un parallèle chimique entre la réaction de Ramon et la formation de notre complexe. Cela revient en un mot à comparer la réaction de Sørensen pour le dosage des acides aminés et bases organiques et la méthode de dosage de ces mêmes corps que nous avons décrite dans le premier chapitre de ce travail.

Le formol va se combiner en milieu sensiblement neutre non seulement aux acides aminés, mais encore à l'ammoniaque et aux bases organiques faibles, à tous les dérivés de la guanidine au moins partiellement. C'est donc un réactif non spécifique et la quantité ajoutée atteint dans bien des cas 100 à 150 millimolécules par litre. Cette quantité doit être supérieure à la quantité d'acides aminés, dosée par la méthode de Sørensen, dans le milieu, pour que la détoxication ait lieu.

Le bromacétate de soude, au contraire, à $\text{pH} = 7$, ne se combine pas à la plupart des acides aminés, aux dérivés de la guanidine et ne semble entrer en réaction qu'avec des bases organiques complexes dont le type nous est fourni par la strychnine. Il apparaît à nos yeux comme un réactif beaucoup plus spécifique de la toxine diphtérique que le formol.

Enfin, l'action du bromacétate permet, croyons-nous, de donner un argument de plus en faveur de la conception de la toxine diphtérique, base organique faible.

De plus, la quantité entrant en réaction pour une dose mortelle de toxine diphtérique pour un cobaye de 250 gr., est de l'ordre de 65 dix milliardièmes de molécule-gramme (65×10^{-10}). En chiffres ronds, 10^{-8} molécule d'acide bromacétique neutralisent 28×10^{-8} gr. de toxine purifiée selon la méthode de Koulikoff et Smirkoff. Ces auteurs auraient obtenu un corps se rapprochant de l'état de pureté, si l'on considère une réaction molécule à molécule entre toxine et bromacétate.

Dans la toxine ainsi modifiée par le bromacétate, nous avons recherché d'une part son pouvoir flocculant, selon la méthode de Ramon et, d'autre part, sa valeur antigénique.

§ 3. — Recherche du pouvoir flocculant et de la valeur antigénique

Ces recherches ont été effectuées à l'Institut Pasteur de Bordeaux, grâce à l'amabilité de MM. les Professeurs Dubreuil et Aubertin.

D'une façon générale, après un séjour à l'étuve variant de 24 heures à 7 jours, nous n'avons trouvé qu'une très faible diminution de la valeur flocculante concordant avec un léger retard dans l'apparition de celle-ci.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU XVI

Toxine	Unité Floculante	Durée séjour étuve	Unité Floculante
139 A ²	14	24 heures	12,8
id.	id.	48 heures	12,5
id.	id.	3 jours	12,5
id.	id.	5 jours	12,1
id.	id.	5 jours + 1 mois à 20 °	11,9
id.	id.	7 jours	12
148 A ²	11,0	3 jours	9,7
id.	id.	3 jours	9,9
id.	id.	5 jours	9,6

Nous voyons donc que le pouvoir floclant est conservé dans une proportion de 80 à 90 %.

Perte totale de la toxicité, conservation du pouvoir floclant, voilà donc deux qualités caractéristiques des anatoxines que présentait notre produit. Nous avons recherché sa valeur antigénique et, pour cela, suivi la technique préconisée par l'école de Ramon, c'est-à-dire : injection de 1 cc. à des cobayes et recherche, un mois après, des unités antitoxiques dans le sérum des animaux vaccinés et étude de leur résistance à l'intoxication diphtérique et à l'inoculation d'une culture de bacilles de Loeffler.

Contrairement à ce que nous aurions pu attendre, aucun des

animaux n'a résisté à l'intoxication par la toxine diphtérique, ni à l'inoculation par une souche microbiennne A.M.P. 8 âgée de 36 heures. Les résultats de notre expérimentation sont transcrits dans le tableau suivant :

15 Avril - 15 Mai

COBAYES ayant reçu

2 cc + Toxine diphtérique + A Br Na 40 milli-molécules/litre 3 jours Etuve à 37°

TABEAU XVII

	Poids au 15 Avril 1935	Toxine + A Br 2 cc le 15 Avril 1935	Poids au 15 Mai	Toxine le 15 Mai 1935	Culture 36 h. A M P 8 le 15 Mai	Résultat	Remarques
46,2	360	3.000 D.M. Neutralisées	400	2 D.M.		Mort.	4 jours.
46,3	510	id.	515	2 D.M.		Survit.	Fatigué.
46,4	410	id.	420	2 D.M.		Survit.	Paral. transit.
46,5	535	id.	530	5 D.M.		Mort.	4 jours.
46,18	325	id.	345	5 D.M.		Mort.	3 jours.
46,19	310	id.	325	5 D.M.		Survit.	Très fatigué.
46,38	225	id.	250	20 D.M.		Mort.	3 jours.
46,39		id.	260	20 D.M.		Mort.	36 heures.
46,40	340	id.	345	50 D.M.		Mort.	2 jours.
46,42	410	id.	400	400 D.M.		Mort.	3 jours.
46,43	280	id.	310	500 D.M.		Mort.	2 jours.
46,44	525	id.	330	1.000 D.M.		Mort.	2 jours.
46,45	415	id.	410		1/2 cc.	Mort.	36 heures.
46,47	345	id.	360		1/2 cc.	Mort.	2 jours 1/2.
46,48	660	id.	630		1/2 cc.	Mort.	2 jours.
46,50	710	id.	690		1 cc.	Mort.	36 heures.
46,51	425	id.	435		1 cc.	Mort.	36 heures.
46,52	380	id.	330		1 cc.	Mort.	36 heures.

N.B. — T + A Br : U.F. = 8,6.

pH = 7,2.

Mort accidentelle de 46-49 et 46-41.

46-41 témoin 1/2 cc. Culture
72,29 témoin 1 cc. Culture

Morts 36 heures.

Le sang des deux cobayes 46-44 et 46-49 recueilli a montré au dosage une quantité d'antitoxine inférieure à 0,03 unité par cc. de sérum.

Notre corps n'avait pas un pouvoir antigénique comparable à celui décrit par Ramon pour ses anatoxines.

Nous nous sommes alors demandé si le pouvoir antigénique du complexe toxine bromacétate était nul. Pour cela, nous avons pris un lot de cobayes auxquels nous avons injecté par trois fois à un mois d'intervalle 1 cc. de notre mélange, puis ayant attendu 30 jours de plus nous leur avons injecté de la toxine diphtérique à des doses variant de 1 D.M. à 1.000 D.M. Dix animaux sur quatorze injectés ont survécu, ainsi que le montre le tableau contenant nos résultats.

COBAYES recevant des injections répétées
1 cc et 2 cc 3 fois

	Poids	15 Mars (1)	16 Avril (2)	Poids
46-11	440	1 cc.	1 cc.	430
46-12	320	1 cc.	1 cc.	525
46-13	280	2 cc.	1 cc.	340
46-15	415	2 cc.	1 cc.	420
46-24	245	1 cc.	1 cc.	200
46-25	275	1 cc.	1 cc.	300
46-26	510	2 cc.	1 cc.	500
46-27	490	2 cc.	1 cc.	470
46-30	340	1 cc.	1 cc.	380
46-31	610	Le 18 Mars 1 cc.	1 cc.	610
46-32	275	1 cc.	1 cc.	340
46-33	425	1 cc.	1 cc.	430
46-34	415	1 cc.	1 cc.	420
46-35	340	1 cc.	1 cc.	380
46-37	520	1 cc.	1 cc.	515

(1) Toxine + A Br U.F. = 8,2

(2) Toxine + A Br — U.F. = 7,5

(3) Toxine + A Br — U.F. = 6,5

5 cobayes : 46-8, 46-9 et 46-10, 46-22 et 46-23

le Bromacétate + Toxine à pH = 9
1 mois d'intervalle

17 Mai (3)	Poids	Toxine le 20 Juin	Poids	Résultats
1 cc.	440	1 D.M.	450	Survit.
1 cc.	530	2 D.M.	520	Survit.
1 cc.	380	2 D.M.	410	Survit.
1 cc.	415	5 D.M.	425	Survit.
1 cc.	310	5 D.M.	360	Mort.
1 cc.	330	10 D.M.	340	Survit.
1 cc.	565	10 D.M.	500	Survit.
1 cc.	490	50 D.M.	520	Mort.
1 cc.	410	50 D.M.	430	Survit.
1 cc.	590	100 D.M.	580	Survit.
1 cc.	380	100 D.M.	410	Mort.
1 cc.	425	500 D.M.	440	Survit.
1 cc.	440	500 D.M.	430	Mort.
1 cc.	400	1.000 D.M.	420	Survit.
1 cc.	530	1.000 D.M.	515	Mort.

Toxine témoin U.F. = 9,2.

Toxines conservées à la glacière.

sont morts accidentellement au cours expérience.

Le complexe bromacétate-toxine avait donc une valeur immunisante qui le rapprochait des cryptotoxines de Vincent, mais il en était différent, puisque, à l'inverse de ces corps, il avait gardé son pouvoir flocculant.

Il nous montrait, en plus, que la loi de parallélisme, établie par Ramon, entre pouvoir antigénique et pouvoir flocculant, qui s'applique exactement dans le cas de l'anatoxine formolée était inexacte dans notre cas et partant ne pouvait pas être généralisée comme le prétend cet auteur.

En contre-partie, l'objection faite par Schmidt à l'existence des cryptotoxiques de Vincent, basée sur l'absence de floculation, perd presque toute sa valeur.

§ 4. — Discussion et interprétation des résultats

Pour expliquer le phénomène de la neutralisation de la toxine par les corps chimiques, la conception de MM. Koulikoff et Smirkoff, assimilant les toxines à des bases organiques faibles nous apparaît comme étant la plus satisfaisante dans l'état actuel de nos connaissances.

Certes, les phénomènes physico-chimiques d'ordre colloïdal peuvent s'appliquer à la neutralisation des toxines par les savons et des corps gras comme la lanoline, mais la conception d'une réaction entre groupements électro-positifs et groupements électro-négatifs s'appliquant mieux à la neutralisation de la toxine par les corps chimiques.

A la lumière des faits étudiés par MM. Ramon, Vincent et leurs élèves et ceux que nous avons pu observer, il nous semble que la théorie de la toxine diphtérique considérée comme un corps chimique à noyau central pourvu de chaînes latérales ou de radicaux multiples et différents lui faisant jouer le rôle de base organique faible est celle qui rend le mieux compte de ce que l'on a pu observer.

Nous distingueront au moins trois fonctions de ces groupes latéraux réagissant avec les corps chimiques :

1° Une première fonction base organique faible, responsable à nos yeux de la toxicité de la toxine. C'est cette fonction qui sera neutralisée par des corps chimiques détoxiquants, agissant en tant que groupements électro-négatifs et ne brisant pas la molécule de toxine.

2° Une autre fonction qui va réagir avec l'antitoxine pour donner avec celle-ci la réaction de floculation.

3° Une ou plusieurs autres fonctions qui vont déterminer dans l'organisme les réactions nécessaires à amener la formation des anti-corps spécifiques.

Nous considérons ces différentes fonctions comme dévolues à des groupes chimiquement définis et différents dans la molécule de la toxine.

Cette conception permet d'expliquer de façon simple l'action :

- a) Des corps chimiques neutralisant la toxine;
- b) Des aldéhydes avec formation des anatoxines;
- c) Des corps cryptotoxiques (agissant chimiquement);
- d) Du bromacétate de soude.

Les corps neutralisant la toxine sans la détruire, c'est-à-dire lorsque l'on pourra, par des manipulations, séparer la toxine du corps chimique après combinaison, auront bloqué les trois séries de fonctions que nous avons envisagées.

Les aldéhydes vont bloquer électivement la fonction base organique faible responsable de la toxicité formant un complexe stable qui garde les propriétés inhérentes aux deux autres groupes de fonctions, c'est-à-dire des corps qui vont flocculer avec l'antitoxine et garder leurs propriétés immunisantes.

Les corps cryptotoxiques du type des acides aromatiques vont, eux, bloquer, d'une part, la fonction toxique et la fonction de floculation, mais vont respecter, au moins en partie, la fonction antigénique; c'est pour cela que nous croyons qu'il existe dans la molécule plusieurs radicaux susceptibles de pro-

voquer l'immunisation de l'organisme; certains seulement seraient neutralisés par les corps cryptotoxiques.

Le bromacétate de soude agissant par son brome en temps que groupement électro-négatif est à nos yeux capable de bloquer la première fonction base organique faible représentant la toxicité de la toxine; il respecterait la fonction de floculation et se comporterait, vis-à-vis des radicaux immunisants, de la même façon que les corps cryptotoxiques, c'est-à-dire n'atteindrait que certains d'entre eux.

Nous arrivons ainsi à une conception qui s'écarte un peu des données classiques et nous avons essayé d'envisager sous le point de vue fonction chimique la neutralisation de la toxine diphtérique.

Nous terminerons en disant que la différence, faite par M. Vincent, entre les anatoxines, les cryptotoxines et les toxines atténuées, nous apparaît entièrement justifiée. Nous ajouterons même une quatrième catégorie dans laquelle nous rangerons la toxine modifiée par le bromacétate; ce complexe nous paraît être intermédiaire entre les anatoxines et les cryptotoxines.

Le rapprochement, déjà ancien, puisque c'est Roux et Yersin qui l'ont fait les premiers, entre toxines et ferments, trouve encore une preuve de plus dans l'action du bromacétate de soude sur ceux-ci et la non activité du chloracétate aux concentrations employées N/20 à N/40, tout comme la fermentation cellulaire, est peu atteinte par les chloracétates et est bloquée par les bromacétates.

CONCLUSIONS

I. — Le bromacétate de Na s'est montré, au cours de nos expériences, un corps formant des complexes définis dans certaines conditions de pH avec des acides aminés et des bases organiques faibles. Tout se passe comme si le bromacétate agissait par son brome, en tant que groupement électro-négatif.

II. — Ces réactions sont quantitatives et nous ont permis de doser en milieu organique les acides aminés et les bases organiques faibles. A chaque corps correspond une courbe de combinaison déterminée en fonction du pH. On peut ainsi, au moins théoriquement, doser, côte à côte, certains acides aminés et bases organiques dans une même solution.

III. — Le complexe bromacétate strychnine est un corps chimiquement défini que nous avons pu isoler. Le corps obtenu est dépourvu de toxicité et il y a parallélisme exact entre la perte de toxicité de la solution et la formation du complexe en fonction du pH.

Le bromacétate a donc électivement bloqué la fonction toxique de la strychnine, ses autres propriétés semblant conservées.

IV. — Le bromacétate de Na s'est révélé comme un réactif détoxiquant de la toxine diphtérique, dans des conditions d'expériences d'une extrême spécificité.

La toxine ainsi traitée garde son pouvoir flocculant et au moins en partie son pouvoir immunisant. Le bromacétate agit à

très faible dose, 65 dix milliardièmes (65×10^{-10}) de molécule gramme suffisent pour neutraliser une dose mortelle de toxine diphtérique pour un cobaye de 250 gr. Il a été possible, comme pour la strychnine, de suivre la combinaison de bromacétate dans la solution de toxine et de montrer que la perte de toxicité va parallèlement à la combinaison du bromacétate (action du temps, de la température, du pH).

BIBLIOGRAPHIE

- ABT. (G.). — Sur la purification de la toxine diphtérique au moyen des précipités de phosphates de chaux. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 1.336 à 1.365.
- ANDERSON. — The antiseptic and germicidal properties of solutions of formaldehyd and its action upon toxins. *Hyg. Lab. Bull.*, 1907, n° 37.
- ASAKAVA. — Immunisation du lapin par des échantillons d'anatoxine diphtérique de valeur antigène différente. Marche de l'immunisation, appréciation du pouvoir immunisant de l'anatoxine par la méthode de floculation, Dosage de l'antitoxine épreuve intracutanée directe. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1933, t. LI, p. 565 à 583.
- BERTHELOT et RAMON. — Sur les agents de transformation des toxines en anatoxines. C. R., *Académie des Sciences*, t. CLXXX, 1925, p. 340.
- *Soc. de Biologie*, t. LXXXXVI, 1927, p. 30.
- BIRKHAUG (K.-E.). — Detoxifying and disinfecting. properties of sodium salicylate. *Jour. infec. Dis.*, 1931, 48, 212.
- *Journ. of Infect. Dis.*, 1931, 48, 212.
- BLEYER (L.). — Das verschiededene Verhalten der Toxine und der Eiweissantigene zu den Na-Salzen der Alkyresorcincarbonensäuren. Die hydrotropischen Eigenschaften dieser Salze. *Ztschr. F. Hyg.*, 1927, 107, 702.
- Ueber einige Wirkungen der Alkylresorcincarbonensäuren und ihre Abhängigkeit von der Konstitution der Alkylseiten-kette. *Bioch. Zeitsch.*, 1927, 181, 351.
- BRISOU. — Thèse es-sciences. Bordeaux 1933, Delmas, éditeur, Bordeaux.

- BRÖNSTED. — *Z. Physik. Chem.*, **102**, 169 (1922); **115**, 337 (1925); *Columbia University Lectures*, « Contemporary Developments in Chemistry », March 1927.
- BRÖNSTED and LIVINGSTON. — *J. of the Am. Chem. Soc.*, **49**, 435 (1927).
- BRÖNSTED and LA MER. — *J. of the Am. Chem. Soc.*, **46**, 555 (1924).
- BRUCKARD (G.). — *Zweil Beiträge zur Kenntniss der Formalin-Wirkung. Central. F. Bakt. Abt.*, 1, 1895, **18**, 257.
- CAYROL et GENEVOIS. — Inhibition spécifique de la fermentation alcoolique des cellules de levure sans arrêt ni de la respiration, ni de la réaction de Pasteur-Meyerhoff, ni de la croissance. *C. R. Soc. de B.*, **192**, 1931, 1494.
- CAYROL. — Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation alcoolique. *C. R. Soc. de B.*, **193**, 446, 1931.
- CAYROL. — Thèse ès-sciences, Bordeaux, 1934 et *Annales de Physiol. et Physicochimie*, **9**, 999, 1933.
- DAVISON (F. R.). — *Journ. of Infect. Dis.*, 1928, **43**, 292.
- DEBYE and HUCKEL. — *Physik. Z.*, **24**, 185 (1923).
- ERLICH (P.). — Wertbmessung des Diphtherieserums. *Klin. Jahreshb.*, 1928 (d'après Löwenstein).
- FITZ-GERALD. — L'anatoxine dans la prévention de la diphtérie au Canada. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 1.089 à 1.097.
- GENEVOIS (L.). — Métabolisme et fonction des cellules. Paris, Masson, 1931.
- GENEVOIS (L.) et BRISOU. — Absence de toxicité des mélanges d'acides halogénés et de leur esters par voie buccale. *C.R., Soc. Biol.*, **112**, 1389, 1933.
- GENEVOIS (L.), CAYROL et NICOLAIEFF (T.). — Action de divers dérivés halogénés sur la cellule de champignons inférieur. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1382, 1933.
- GENEVOIS (L.) et KIRRMANN (A.). — Action des aldéhydes et des cétones bromés sur les cellules de levure, *C. R., Soc. Biol.*, **112**, 1383, 1931.
- GENEVOIS et MANDILLON. — Possibilité de titrer séparément diverses bases organiques et acides aminés au moyen du bromacétate de Na en milieu biologique. *Soc. Chimie-*

- que de France, Sec. de Bordeaux, 9 fév. 1935, in *Bull. Soc. Chimique de France* (5° s.), **2**, 1935, p. 683.
- Détoxication de la toxine diphtérique. Expérimentation chez l'animal. *Soc. des Sc. Phys. et Nat. de Bordeaux*, avril 1935.
- Propriétés des complexés formés par l'acide bromacétique et diverses bases et toxines organiques. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXVIII, 1935, p. 1353.
- GENEVOIS (L.) et NICOLAIEFF (T.). — Inhibition de la fermentation lactique bactérienne par les acides aliphatiques halogénés en α . C.R., *Acad. Sc.*, **194**, 1270, 1932.
- Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation lactique bactérienne, C.R., *Soc. Biol.*, **112**, 1385, 1933.
- GRONWALL, LA MER and SANDVED. — *Physik, Z.*, **29**, 358 (1928).
- HANS THACHER CLARK. — The relation between Reactivity and chemical constitution of certain halogen compounds. *Chem. Soc.*, **97**, 1. 416, 1910.
- HENRY (T.-A.). — The Plant Alkaloids, London, 1924, p. 191.
- JACOBSON (J.). — I. L'action de l'alcool benzylique sur les toxiques et sur la tuberculine. Affinité de l'alcool benzylique pour les diastases et pour les toxines. C.R., *Soc. Biol.*, 1920, **83**, 525, 1054.
- KAPPANA. — *J. Indian Chem. Soc.*, **6**, 45 (1929), For bromacetate alt, **5**, 293 (1928); For chloro-acetate.
- KINLEY (J.-M. Mc) et LARSON (W.-P.). — *Proc. Soc. for exper. Biol. A. Med. Assoc.*, 1926, **24**, 297.
- KOULIKOFF et SMIRNOFF. — Nature physico-chimique de la toxine et de l'anatoxine diphtériques. *Annales Institut Pasteur*, **41**, p. 1.166, 1927.
- KRAPIVIN. — *Z. Physik. Chem.*, **82**, 439 (1913); See also *J. Chim. Physik.*, **10**, n° 2, 289 (1912); for data on the Chloro Acetate Reaction.
- KREBS (H.-A.). — Uber die Wirkung der monoiodessigsäure auf den Zellstoffwechsel. *Biochem. Z.*, **234**, 278, 1931.
- LA MER (Victor-K.). — Chemical Kinetics in highly dilute Solution Bromo-Acetate and Thiosulfate Ions in the presence of Sodium Ion at 25°. *Journal of the American Chemical Society*, 1929, p. 3341.

- *Trans. Am. Electrochem. Soc.*, **61**, 631 (1927).
- LA MER and MASON. — *J. of the Am. Chem. Soc.*, **49**, 410 (1927), also p. 363.
- LA MER and COOK. — *Ibid.*, **51**, 2.622 (1929).
- LA MER and GOLDMAN. — *Ibid.*, **51**, 2.632 (1929).
- LARSON (W.-P.) and coworkers. — *Proc. Soc. for exper., Biol. A. Med.*, 1924, **21**, 133, 278; 1925, **22**, 194, 357, 549, 550, 552. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1926, 86, 998.
- LARSON (W.-P.) et EWANS (R.-D.) et NELSON (E.). — The effect of sodium ricinoléate upon bacterial toxine and the value of so anatoxins as antigen. *Ibid.*, 1922, **22**, 194.
- LARSON (W.-P.) et HALVORSON (H.-O.). — The effect of H ions concentration upon the neutralisation of toxin by sodium ricinoleate. *Ibid.*, 1925, **22**, 550.
- LARSON (W.-P.), HANCOCK (E.-W.) et EDER (H.). — Antidiph-térique immunisation using sodium ricinoleate as detoxi-fying agent. *Ibid.*, 1925, **22**, 552.
- LEGROUX et RAMON. — Hyperactivation des toxines. *C. R. Ac. des Sciences*, 1934, p. 620.
- LOEWE (S.). — *Bioch. Ztschr.*, 1911, **33**, 225.
- LOWENSTEIN (E.). — Toxine und Toxoide, in Abderhalden. *Handb. d. biol. Arbeits. Methoden*, **132**, 1031, 1140.
- MARIE (A.). — Du mode d'action de l'adrénaline sur les toxines microbiennes. *Ibid.*, 1919, **33**, 645.
- MARTIN, LOISEAU, LAFAILLE. — L'immunisation antidiph-térique par l'anatoxine chez l'homme. Application à la prophylaxie de la diphtérie. *Ann. Institut Pasteur*, 1928, t. XXXXII, p. 1.010-1.038.
- MOLONEY et FRASER. — Préparation de l'anatoxine diphtéri-que et vérification de ses propriétés. *Ann. Inst. Pas-teur*, t. XXXXII, 1928, p. 1.420-1.424.
- NATTAN, LARRIER, RAMON et GRASSET. — Contribution à l'étude du passage des antigènes et des anticorps à travers le placenta. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXI, 1927, p. 862 à 867.

- NECHTCHADINENKO (P.). — L'action préventrice de l'anatoxine diphtérique vis-à-vis de l'infection diphtérique par la trachée chez l'animal d'expériences. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 1.129 à 1.147.
- NELIS (P.). — Du rôle de différents facteurs intervenant dans l'immunisation active contre la diphtérie au moyen de l'anatoxine. *Ann. Inst. Pasteur*, t. L, 1933, p. 79 à 88.
- Action de l'oléate de soude sur la toxine diphtérique. *C.R., Soc. Biol.*, 1924, **91**, 1.159.
- Nouvelles recherches sur la vaccination antidiphtérique. *Ibid.*, 1924, **92**, 1.114.
- Action de la quinine sur la toxine diphtérique. *Ibid.*, 1925, 1.116.
- Action de l'ozone sur la toxine diphtérique. *Ibid.*, 1926, **94**, 139.
- Nouvelles recherches sur l'action de l'oléate de soude vis-à-vis de la toxine diphtérique. *Ibid.*, 1933, **114**, 591.
- NETTER (A.), ANDRÉ (E.), CESARI et COTTON. — Action du ricinoléate de soude sur les bactéries et sur les toxines. *C.R., Soc. Biol.*, 1927, **96**, 184.
- NEUBERG et KOBEL (M.). — Fehlerquellen bei Werwendung von Iodessigäure als garungs hemmendes Agens. *Biochem Z.*, **238**, 239, 1931.
- NINNI (C.). — Azione della bila sulla tossina tetanica. *Ann. D. Igien.*, 1921, **31**, 121.
- NISHIURA (J.). — *Zeitschr. f. Immunforsch.*, **64**, 1929, 238.
- PERKIN et DUPPA. — *Chem. Soc. Quat. Journ.*, **11**, 122.
- PICTET et NATTISON. — *Ber. D. chem. Gesell.*, t. XXXVIII, 1907, p. 2.782.
- POLONOVSKI (M.). — *C. R. de la Soc. de Biol.*, t. XCIV, 1926, p. 145.
- POLONOVSKI (Max et Michel). — *C.R. de l'Acad. des Sc.*, t. CLXXXI, 1925, p. 882.
- *C.R. de l'Acad. des Sc.*, t. CLXXX, 1925, p. 887.
- POLONOVSKI (M.) et NITZBERG (C.). — *Bull. de la Soc. de Chimie*, t. XVII, 1915, p. 290.

- POLONOVSKI (Michel) et COMBEMALE (Pierre). — *C.R. de la Soc. de Biol.*, t. LXXXVIII, 1923, p. 881.
- QUÉRÉ (H.). — Inhibition de la fermentation acétique par divers dérivés halogénés. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1.388, 1933.
- RAMON (G.). — La vaccination antidiphtérique et la vaccination antitétanique au moyen des anatoxines spécifiques et les vaccinations associés dans la pratique. *Revue d'Immunologie*, t. I, n° 1, p. 37, 1935.
- RAMON (G.), DEBRÉ (Robert) et SÉE (G.). — Mode d'action de l'immunité créée par l'anatoxine diphtérique. Etude expérimentale. *Revue d'Immunologie*, 1935, t. I, n° 1, p. 85.
- Sur les propriétés essentielles de l'anatoxine diphtérique. *Ann. Inst. P.*, 1931, **46**, 483.
- RAMON et NÉLIS. — De l'importance de la valeur antigène de l'anatoxine dans la vaccination antidiphtérique parallélisme entre le pouvoir flocculant et le pouvoir immunisant. *Ann. Inst. Pasteur*, 1933, t. L, p. 66 à 78.
- RAMON et DEBRÉ. — Valeur et durée de l'immunité conférée par l'anatoxine diphtérique (dosage de l'antitoxine dans le sérum des enfants vaccinés). *Bull. Académie de Médecine*, 1930, I, p. 214 à 221.
- RAMON (G.). — Sur une technique de titrage *in vitro* du sérum antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 711.
- Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtérique. Pouvoir flocculant et propriétés immunisantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, **38**, 1.
- RAMON et DEBRÉ. — Sur la teneur en antitoxine spécifique du sérum des sujets vaccinés par l'anatoxine diphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXV, 1930, p. 326, 336.
- RAMON et GRASSET. — Recherches sur le passage des toxines, des anatoxines et des antitoxines à travers les parois du tube digestif. De l'immunité antitoxique active et passive par voie digestive chez l'animal d'expériences. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XXXI, 1927, p. 868 à 878.

RAMON. — Sur la toxine et l'anatoxine diphtérique, pouvoir flocculant et propriétés immunisantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, t. XXXVIII, p. 1.

— Sur le contrôle de la mesure des propriétés de l'anatoxine diphtérique. *B. de l'Académie de Médecine*, 1925, I, p. 173 à 176.

— L'anatoxine diphtérique, ses propriétés, ses applications, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 959 à 1.009.

— L'anatoxine diphtérique dans son application à l'immunisation active de l'homme et à la prophylaxie de la diphtérie. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1930, t. XXXXV, p. 291-325.

— L'anatoxine diphtérique dans son application à l'immunisation active de l'homme et à la prophylaxie de la diphtérie. *B. de l'Académie de Médecine*, 1930, II, p. 115 à 123.

RAUBITSCHCK (H.) et RUSS (V.-K.). — Uber antgiftende Eigenschaften der Seife. *Zeitsch. F. immunitäts.*, 1909, I, 395.

RENAUX (Ernest). — Contribution à l'étude de la réaction de précipitation dans les mélanges de toxines et d'antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 356 à 362.

RENAUD (M.). — Sur les propriétés des complexes savonneux des métaux lourds. *Comptes rendus S. de Biol.*, 1930, p. 143.

— *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 496; 1930, **105**, 365, 456.

RADOEFF (A.). — Inhibition de la fermentation alcoolique des végétaux supérieurs par l'acide monobromacétique et ses esters. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1393, 1933.

ROUX (E.) et YERSIN. — Contribution à l'étude de la diphtérie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, **2**, 629.

SALKOWSKY (E.). — Ueber die Wirkung der antiseptica auf toxine. *Bioch. Zeitsch.*, 1913, **50**, 453.

SALKOWSKY (E.). — *Berl. Klin. Wochenschr.*, **25**, 1898, 545; *Biochem. Zeitschr.*, **50**, 1913, 483.

SBARSKI (B.) et SOUBKOWA (L.). — Contribution à l'étude de l'immunité. De l'influence des amino-acides sur la toxine diphtérique. *Journ. Biol. et Médéc. exper.* (russe), 1926, **1**, 170.

SBARSKI (B.) et JERMOLJENA (Z.). — Zur Kenntniss des Mechanismus der Immunitätserscheinungen. III. Ueber den Einfluss Einigen Aminosäuren auf die Wirkung des Tetanustoxine. *Bioch. Zeitsch.*, 1927, **182**, 180.

SCHMIDT. — Le phénomène de floculation des toxines diphtériques et tétaniques vis-à-vis de leurs antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 62, **104**.

— *Acta Pathol. Microb. Scand.*, suppl. 12, 1923; *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 1933, 379, **113**, 1933, 882.

— Influence de divers sels sur la stabilité de la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 95.

— Influence de quelques hydrures de carbone et de leurs dérivés halogénés sur la toxine diphtérique. II. Influence de quelques alcools, éthers et éthers sels sur la toxine diphtérique. III. Influence de diverses aldéhydes sur la toxine diphtérique. IV. Influence de quelques acides organiques sur la toxine diphtérique. V. Influence de quelques amines et amides aliphatiques sur la toxine diphtérique. VI. Influence de quelques dérivés du benzène sur la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 146, 148, 151, 536, 357.

— Studien über den Einfluss verschiedener aliphatischer und aromatischer Verbindungen auf das Diphterie Toxine. *Bioch. Zeitsch.*, 1932, **256**, 158.

— Influence de la concentration en ions hydrogène sur la stabilité de la toxine diphtérique et en particulier sur sa fonction floculante. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 706.

— Toxines et antitoxines. Constitution et mode d'action. *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **45**, 337.

SCHWARTZ et OSCHMANN. — Contribution au problème du mécanisme des contractures musculaires. Le taux de l'acide phosphorique musculaire libre dans les con-

- tractures des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 275, 1925.
- Le taux de l'acide lactique musculaire dans les contractions des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *Ibidem*, **92**, 169, 1925.
- SCHWARTZ. — Le degré de tension et de raccourcissement musculaire dans les contractions des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 1396, 1925.
- SEDALLIAN (P.) et VELLUZ (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 826; *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 496.
- Sur le mécanisme d'action des acides gras et, en particulier, des acides non saturés et de leurs savons sur les bactéries et les toxines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 826.
- SLATOR. — The chemical dynamics of the Reactions between sodium Thiosulfate and Organic Halogen Compounds. Halogen-substituted Acetates. *Chem. Soc.*, **87**, 481, **4**, 1905.
- SURMONT (H.) et POLONOVSKI (Michel). — *Bull. de l'Acad. de Méd.*, t. LXXXIX, 1923, p. 292. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, t. XCIV. Sur la toxicité du N - oxyde de strychnine.
- VAN BOECKEL. — Rapport sur les renseignements et résultats acquis en Belgique sur les diverses méthodes d'immunisation active contre la diphtérie. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 1.098 à 1.128.
- VELLUZ (H.). — Influence de la structure chimique sur les propriétés cryptotoxiques des acides phénols. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 583.
- Sur les propriétés antitoxiques de certains diphénols et leur mode d'action. *C. R. Ac. Sci.*, 1931, **193**, 372.
- leur mode d'action. *C. R. Ac. Soc.*, 1931, **193**, 372.
- Nouvelles recherches sur les agents cryptotoxiques. *Ibid.*, 269.
- Les cryptotoxines. *Journ. Pharm. et Chim.* (VIII^e s.), 1932, **15**, 400.

- Action du pyrophosphate de sodium sur la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **112**, 556.
 - Action des savons sur la toxine de certains alcaloïdes. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **189**, 1325.
 - Recherches sur le phénomène de neutralisation des toxines par les aldéhydes. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 745.
 - Remarques sur les propriétés cryptotoxiques générales des savons. II. Recherches sur les complexes strychnine savons (crypto-strychnine). III. Action des savons sur la toxicité de quelques sels métalliques (complexes crypto-métalliques). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 302, **104**, 974, **105**, 634.
 - *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 178.
- VINCENT (H.). — Action de la bile sur la toxine tétanique. II. Deuxième note sur les propriétés antitoxiques de la bile. Action des éléments composants de la bile sur la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1907, **63**, 623, 695.
- Sur quelques principes généraux relatifs aux antitoxines. II. Sur quelques propriétés communes aux cryptotoxines et aux antitoxines. *Ibid.*, 1933, **133**, 42, 130.
- VINCENT (H.) et VELLUZ (L.). — Sur les propriétés cryptotoxiques des acides bibenzoïques. II. Sur les propriétés immunigènes de la cryptotoxine diiodosalicylique. *C. R. Ac. Sc.*, 1931, **192**, 648 et 1931, **193**, 969.
- Sur les propriétés cryptotoxiques de l'oxynaphtoate de sodium. Son action spéciale sur la toxine diphtérique. *Ibid.*, 1932, **194**, 1697.
- VINCENT (H.). — Etude expérimentale sur le sort de la toxine diphtérique dans le tube digestif. *Ann. Inst. Pasteur*, 1908, **22**, 341.
- Action antitoxique de la bile sur les toxines microbiennes de l'intestin. *C. R. Soc. Biol.*, 1909, **67**, 679.
 - Sur les cryptotoxines biliaires. *Ibid.*, 1926, **95**, 1525.
 - Sur les propriétés générales des cryptotoxines, en particulier de la cryptotoxine tétanique. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, **182**, 1307.

- Nouvelles recherches sur les cryptotoxines microbiennes. *Ibid.*, 1927, **184**, 921.
 - Sur quelques substances non colloïdales à propriétés cryptotoxiques. *Ibid.*, 1928, **186**, 1.175.
 - Recherches sur les propriétés antitoxiques et antimicrobiennes du salicylate de sodium. *Bull. Ac. Médec.*, 1928, **100**, 783.
 - Action antitoxique du salicylate de sodium et de quelques dérivés substitués sur la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **191**, 463.
 - Nouvelles recherches sur les cryptotoxines. Le phénomène de sursaturation des toxines par l'ion salicylique. *Ibid.*, 1931, **193**, 620.
 - Sur quelques propriétés générales des cryptotoxines. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 15.
- WALKER (J.-E.). — The germinicidal properties of soap. *Journ. Infect. Dis.*, 1925, **37**, 181 et 1926, **38**, 127.
- WELLS (H.-G.). — Les aspects chimiques de l'immunité (traduc. Boez). Doin. 1928.
- WALBUM (L.-E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1922, **129**, 130.
- Das diphterietoxine. Abderhalden. *Hand. d. Bioch. Arbeitsmethoden*, **13**, 595 (avec une bibliographie abondante jusqu'en 1924).
- ZDRODOWSKI et HALIAPINE. — Recherches expérimentales et observations cliniques sur l'anatoxine diphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXXXII, 1928, p. 1.424 à 1.446.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

Les Hormones sexuelles Leur action dans le règne végétal.

VU : *Le Doyen,*
J. CHAINE.

VU, BON A IMPRIMER :
Le Président,
J. CHAINE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Bordeaux, le 4 Novembre 1935.
Le Recteur de l'Académie,
TERRACHER.

